

IAP20 Rec'd PCT/PTO 14 DEC 2005

- 1 -

明細書

親和性物質の測定方法

5 技術分野

本発明は担体粒子の凝集反応を利用した親和性物質の測定方法、および装置に関する。

背景技術

- 10 生物学的特異的反応性物質の存在を検出または測定する方法としては、例えば、酵素免疫測定法、あるいは放射線免疫測定法などが従来から用いられている。これらの方法は高感度であり精度も高い。しかし酵素、あるいは放射性同位元素を標識として使用するため試薬が不安定である。また放射性同位元素の利用にあたっては、保管および保存上の規制があることから、測定において細かい配慮や技術
- 15 術を要求される。そのため、より簡便な測定方法が求められていた。またこれらの方法は測定に比較的長時間を要するため、緊急な検査に対応することが難しい。これらの背景のもとで、高感度且つ迅速な測定方法が盛んに研究されるようになった。

- 1 9 7 0 年以降、免疫学的反応を担体粒子の凝集を指標として測定する分析方法が実用化された。この方法は、担体粒子の凝集の程度を光学的に測定することによって、定量的な分析を可能とした。担体粒子としてラテックス粒子を利用した、免疫学的粒子凝集反応を光学的に測定する方法は、ラテックス凝集比濁法 (Latex Agglutination Turbidimetry) と呼ばれている。これらの分析方法における反応温度は、一般的には 3 7 ~ 4 5 °C の範囲で行われ、攪拌翼などによって攪拌することにより特異的凝集反応が進行する。このとき測定 (反応) に要する時間は、
- 20 25 およそ 1 0 ~ 2 0 分で、酵素免疫測定法、あるいは放射線免疫測定法に比べ迅速

- 2 -

である。一方、測定感度、あるいは測定範囲については、酵素免疫測定法等に比べ劣るといわれている。

ラテックス凝集法における粒度分布測定法も公知である（非特許文献1／カンビアソら, J. Immunol. Methods 18, 33, 1977、非特許文献2／松沢ら, 化学と工業, 第36巻, 第4号, 1982）。ラテックス凝集比濁法が、粒子懸濁液の光の透過度を測定するのに対して、粒度分布測定法においては分散した個々の粒子の状態や数が測定される。カンビアソらの報告においては、粒子径0.8 μm のラテックスに抗体を結合させた試薬と抗原とを37℃で20分間反応させた。反応後の粒子数を計数し、凝集による粒子数の減少のレベルに基いて抗原を測定した。粒子数は、レーザー散乱光を原理とした計数機で測定した。

一方、松沢らは、粒子径1 μm のラテックス粒子に抗体を結合させた試薬を抗原と6時間反応させた。反応後、電気抵抗法により平均粒子容積を計測して、抗原を測定した。しかし、実用化されて普及したのはシースフローによるレーザー散乱法を用いたPAMIAシステム（シスメックス株式会社）のみである。PAMIAでは、粒子径0.78 μm のラテックス粒子が使用されている。45℃で15分間の反応後にラテックス粒子を計数して免疫測定を行うものである。PAMIAは、ラテックス凝集比濁法に比べ高感度化されているが、放射免疫測定法(RIA)や酵素免疫測定法(EIA)といった高感度免疫測定に比べると感度は劣るといわれている。

ラテックス凝集比濁法においては、一般に粒子径0.05～0.6 μm のラテックス粒子が用いられている。ラテックス凝集粒度分布解析法の場合は、このように小さい粒子では、測定妨害物質の影響を受けやすい。たとえば、血液や尿などの体液中には、脂質、蛋白、血球成分などが共存する。これらの共存物質は担体粒子との識別が難しい。そのため担体粒子を正しく計数できない場合がある、これらの測定妨害物質の影響を避けるために、比較的大きい粒子が使用されてきた。一方で、松沢らのように1 μm 程度の粒子径になると、凝集反応が起こりにくくな

- 3 -

るため、 $0.8\ \mu\text{m}$ 程度のラテックス粒子が用いられていた。また、松沢らが平均粒子容積を計測するのに使用したアパーチャー（細孔）の口径は $30\ \mu\text{m}$ である。このサイズではアパーチャーの詰まりの影響を受けやすい。しかし、これより大きい口径のアパーチャーでは $0.8\sim 1\ \mu\text{m}$ の粒子の検出はできなくなる。

- 5 更に、生物学的特異的凝集反応を促進し、また形成する凝集塊を検出しやすくするために、反応系に交流電圧を印加する方法が公知である（特許文献1／特開平7-83928号）。この方法は、担体粒子の生物学的特異的凝集反応により生物学的特異的反応性物質の存在を検出又は測定する方法であって、 10mM 以上の塩の共存下に $5\sim 50\text{V/mm}$ の電界強度になるように交流電圧を該反応系に印加
- 10 することを特徴とするものである。

担体粒子は、電場に置かれると電場に沿って直線的に並ぶ（パールチェーン化）。その後電場を停止すると直線的に並んでいた担体粒子は再分散する。パールチェーン化の際に生物学的特異的反応性物質が存在すると、電場を停止後も担体粒子の再分散が起らず、パールチェーン化した担体の存在がなお認められ

15 る。前記測定方法は、この現象を利用している。すなわち、電場においては、生物学的特異的反応性物質の反応が促進される。そして電場を停止後に担体粒子を再分散させれば、反応生成物を検出することができる。

発明の開示

- 20 前記公知技術においては、生物学的特異的反応性物質の反応は、担体粒子の凝集を指標として検出される。担体粒子の凝集は、二次元の画像データに解析によって検出されていた。具体的には、まずスライドガラス上に電極を所定の間隔に接着して、この電極間（セル）に試薬と検体を混合させた反応液を滴下してこの部分をカバーガラスで覆い、電極に電圧を印加して電場を与える。電場を停止後、
- 25 電極間の反応液中の担体粒子の凝集塊が顕微鏡等で観察される。

しかし、このような実験操作は煩雑で機械化の障害となる。またスライドガラ

- 4 -

5 スを顕微鏡で観察する方法では、高度な感度や再現性を維持するのが難しい。たとえば、スライドガラスのような限られた空間に收容しうる反応液は微量である。つまりサンプルも担体粒子の数も制限される。その結果、十分な測定感度を期待することは困難となる。また、微量の反応液において、サンプルと担体粒子の量的な割合や反応温度などの反応条件を一定に保つためには高度な技術が要求される。したがって、再現性を高い水準で維持することは難しい。

加えて公知の方法は、凝集粒子の検出方法にも課題を有していた。公知の方法においては、凝集粒子は、顕微鏡で観察された画像情報に基づいて計数されていた。つまり二次元の情報に基づいて凝集粒子を観察していた。ところが、二次元
10 の情報では、さまざまな要因によって凝集塊を正しく検出できない場合のあることが明らかになった。

たとえばパールチェーン状に結合した凝集塊は、パールチェーンの長さ方向に対して直角の方向から観察しなければ、その大きさを正しく評価することができない。パールチェーン状の凝集塊を長さ方向と同じ方向から観察すると、凝集し
15 ていない粒子とほとんど同じ大きさにしか見えない。逆に粒子が凝集塊を形成していない場合でも、粒子同士が重なって見える位置関係にあると、凝集塊として計数されてしまう可能性がある。二次元の情報は、特定の方向から捉えることができる粒子の形のみを表している。したがって、もしも粒子が、観察する方向によって異なる形を示す場合には、二次元の情報によって粒子の大きさを正しく評
20 価することができない。このように、二次元的な情報に基づく粒子の計数方法は、測定精度を制限する要因となっていた。

本発明は、これらの問題点の改善を目的としている。より具体的には、機械化が容易で、かつ測定精度の維持が容易な測定方法の提供を課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために、担体粒子の凝集塊の計測手段につ
25 いて検討を重ねた。その結果、粒子あるいは凝集塊を、その三次元情報を指標として計数することによって、測定精度が改善されることを見出し本発明を完成し

た。すなわち本発明は、以下の測定方法、および測定装置に関する。

〔１〕次の工程を含む、親和性物質の測定方法。

(1)測定対象親和性物質との結合活性を有する結合パートナーを結合した担体粒子と、測定対象親和性物質とを混合し、電圧パルス印加する工程、または

5 (1')測定対象親和性物質との結合活性を有する結合パートナーを結合した担体粒子と、測定対象親和性物質とを、凝集試薬成分と混合し、電圧パルス印加する工程であって、前記担体粒子は凝集試薬によって凝集し、かつ測定対象親和性物質によってその凝集は阻害される工程

10 (2)工程(1)の後に、測定対象である親和性物質との結合によって形成された担体粒子の凝集塊、および測定対象である親和性物質と結合せず凝集塊を形成しなかった担体粒子のいずれかまたは両方を、その三次元情報を指標として計数する工程、または

15 (2')工程(1')の後に、凝集試薬との結合によって形成された担体粒子の凝集塊、および測定対象である親和性物質との結合によって凝集を阻害された担体粒子のいずれかまたは両方を、その三次元情報を指標として計数する工程、および

(3)工程(2)または(2')の後に、凝集塊の形成レベル、および凝集塊を形成しなかった担体粒子のレベルのいずれか、または両方に基づいて測定対象物質のレベルを決定する工程

20 〔２〕工程(2)または(2')において、凝集塊または担体粒子の三次元情報を、物理的に測定する〔１〕に記載の方法。

〔３〕三次元情報を物理的に測定するための方法が、電気抵抗法、レーザー回析散乱法、および三次元画像解析法からなる群から選択されたいずれかの方法である〔２〕に記載の方法。

25 〔４〕電圧パルスが交流電圧パルスである〔１〕に記載の方法。

〔５〕工程(2)または(2')において、電場を停止後に担体粒子を計数することを

- 6 -

特徴とする〔１〕に記載の方法。

〔６〕工程（２）または（２'）において、電場を停止後に更に付加的に担体粒子を希釈する工程を含む〔５〕に記載の方法。

〔７〕電圧パルスを複数回与えることを特徴とする〔１〕に記載の方法。

５ 〔８〕電圧パルスを印加後に、担体粒子を分散させてから次の電圧パルスを印加する工程を含む、〔７〕に記載の方法。

〔９〕複数回の電圧パルスが、異なる方向の電圧パルスである〔７〕に記載の方法。

〔１０〕担体粒子の平均粒子径が、 $1\text{ }\mu\text{m}$ 以上である〔１〕に記載の方法。

１０ 〔１１〕担体粒子の平均粒子径が、 $1\text{ }\mu\text{m}\sim 20\text{ }\mu\text{m}$ である〔１０〕に記載の方法。

〔１２〕次の手段を含む、親和性物質の測定装置。

（ａ）測定対象親和性物質との結合活性を有する結合パートナーを結合した担体粒子と、測定対象親和性物質とを保持する空間、

１５ （ｂ）前記空間に保持された担体粒子に電圧パルスを印加するための電極、および

（ｃ）前記空間に保持された担体粒子の凝集によって生じた凝集塊、および凝集しなかった前記担体粒子のいずれかまたは両方を、その三次元情報を指標として計数する手段

２０ 〔１３〕（ｃ）前記空間に保持された担体粒子の凝集によって生じた凝集塊、および凝集しなかった前記担体粒子のいずれかまたは両方を、その三次元情報を指標として計数する手段が、三次元情報を物理的に測定するための手段である〔１２〕に記載の装置。

〔１４〕三次元情報を物理的に測定するための手段が、電気抵抗法、レーザー回析散乱法、および三次元画像解析法からなる群から選択されたいずれかの方法によって三次元情報を物理的に測定するための手段である〔１
２５ ３〕に記載の装置。

- 7 -

〔15〕少なくとも2組の電圧パルスを印加するための電極を有する〔12〕に記載の装置。

〔16〕電圧パルスを印加するための電極を駆動する手段を有し、前記空間に対して異なる方向の電場を与えることができることを特徴とする〔12〕

5 に記載の装置。

本発明において親和性物質、および親和性物質との結合活性を有する結合パートナーとは、結合反応を構成することができるあらゆる物質の組み合わせを含む。すなわち、ある物質とある物質とが結合するとき、一方が親和性物質であり、他方は結合パートナーである。本発明における親和性物質および結合パートナーは、
10 天然の物質であることもできるし、人工的に合成された化合物であってもよい。また親和性物質および結合パートナーは、精製された物質であることもできるし、不純物の共存も許容される。更に、親和性物質および結合パートナーは、細胞やウイルスの表面に存在していてもよい。

本発明において、親和性物質と結合パートナーとの結合反応の例として、たとえば次のような反応を示すことができる。これらの反応を構成する物質は、いずれも本発明における親和性物質または結合パートナーとすることができる。
15

抗原またはハプテンと抗体との反応（免疫反応）

相補的な塩基配列を有する核酸間のハイブリダイゼーション

レクチンとそのレセプターとの反応

20 レクチンと糖鎖の反応

リガンドとレセプターの反応

DNAと転写調節因子の反応

上記結合反応の中で、本発明における好ましい結合反応として、たとえば免疫反応を示すことができる。免疫反応を構成する抗原として、次のような物質を示すことができる。これらの抗原は、抗原分子そのもののみならず、その断片や、
25 細胞表面に存在した状態であっても良い。なおこれらの物質は抗原物質の例であ

- 8 -

り、これら以外の抗原物質に本発明を応用できることは言うまでも無い。たとえば、ラテックス、血球等を担体として使用する免疫学的凝集反応に基づく測定が可能な抗原性物質は、いずれも本発明における親和性物質とすることができる。

腫瘍マーカー：

- 5 A F P、C E A、C A 1 9 - 9、P S A等

凝固線溶系マーカー：

プロテインC、プロテインS、アンチトロンビン (A T) I I I、F D P、F D P
- D - ダイマー等

感染症マーカー：

- 10 C R P、A S O、H B s 抗原等

ホルモン：

甲状腺刺激ホルモン (T S H)、プロラクチン、インシュリン等

組織成分：

ミオグロビン、ミオシン、ヘモグロビン等

- 15 その他：

D N A等の核酸など

- 20 抗原性物質とそれを認識する抗体は、いずれかを親和性物質として、そして他方を結合パートナーとして利用することができる。本発明において親和性物質とは、当該物質を測定対象とするときに、親和性物質と呼ぶ。他方、結合パートナーとは、親和性物質を測定するためにプローブとして利用することができる、当該親和性物質に対する結合活性を有する物質を言う。したがって、抗原を測定するときには、抗体を結合パートナーとして利用することができる。逆に、抗体を測定するときには、該抗体が認識する抗原を結合パートナーとして利用することができる。たとえば、ラテックス、血球等を担体として使用する免疫学的凝集反
- 25 応に基づく測定が可能な抗体は、いずれも本発明における親和性物質とすることができる。H B s (B型肝炎ウイルス表面抗原)、H B c (B型肝炎ウイルスコ

- 9 -

ア抗原)、HCV (C型肝炎)、HIV (AIDSウイルス)、TP (梅毒) 等に対する抗体が、免疫学的凝集反応によって測定されている。

5 親和性物質と結合パートナーとの反応を担体粒子の凝集を指標として測定するためのいくつかの反応原理が公知である。これらの反応原理は、いずれも本発明に応用することができる。以下に担体粒子の凝集を指標とする、親和性物質と結合パートナーとの反応を利用した測定原理を例示する。

直接凝集反応：

測定対象物質と担体粒子上の結合パートナーとの反応による、担体粒子の凝集が検出される。たとえば、抗原分子を結合パートナーである抗体によって測定する
10 場合が、この原理に含まれる。あるいは逆に、抗原を結合した担体粒子の凝集を指標として、親和性物質である抗体を測定する場合も、この原理に含まれる。直接凝集反応においては、通常、凝集のレベルと測定対象物質である親和性物質の量は正比例する。すなわち、凝集塊の形成レベルが高いときには、親和性物質のレベル (すなわち濃度) が高い。逆に、凝集塊を形成しなかった担体粒子の
15 レベルが高いときには、親和性物質のレベル (すなわち濃度) は低い。

凝集阻止反応：

ハプテンと呼ばれる低分子抗原は、担体粒子の凝集に必要な抗原を介した架橋構造を作りにくい。そのため、直接凝集反応の原理ではハプテンを検出することができない。そこで、複数分子のハプテンまたはそのエピトープを含む断片を担
20 体に結合したポリハプテンと、担体粒子上の抗体との結合による凝集反応が利用される。ポリハプテンは、複数の抗体分子を架橋することができるので、担体粒子を凝集させる。しかしハプテンが存在すると、ポリハプテンと抗体との反応が阻止され、担体粒子の凝集が阻止される。凝集阻止のレベルは、ハプテンの存在と正比例する。言い換えれば、測定対象物質の量と、凝集反応のレベルは逆比例
25 する。すなわち、凝集塊の形成レベルが高いときには、親和性物質のレベル (すなわち濃度) が低い。逆に、凝集塊を形成しなかった担体粒子のレベルが高いと

- 10 -

きには、親和性物質のレベル（すなわち濃度）は高い。

ハプテンに分類される測定対象抗原には、以下のような成分が挙げられる。

ホルモン：

エストロゲン、エストラジオール

5 薬剤：

テオフィリン

本発明においてハプテンを凝集阻止反応の原理に基づいて測定するためには、ハプテンに対する抗体を結合した担体粒子を凝集させることができる成分が必要である。ハプテンに対する抗体を結合した担体粒子を凝集させることができる成分を、本発明においては凝集試薬と言う。凝集試薬は、抗体との特異的な親和性を有し、かつ抗体との結合によって担体粒子を架橋する作用を有する試薬と定義される。先に述べたポリハプテンは、ハプテンの測定において凝集試薬として用いることができる。

15 直接凝集反応であれ、凝集阻止反応であれ、予め一定量の親和性物質を含む標準試料について同じ反応系で測定して、凝集塊あるいは凝集しなかった担体粒子のレベルを測定して標準曲線、または回帰式を作成しておくことができる。試料の測定によって得られた凝集塊の形成レベルおよび凝集しなかった担体粒子のレベルのいずれかを、標準曲線あるいは回帰式に適用すれば、試料中の親和性物質のレベルを決定することができる。

20 本発明において、結合パートナーは、担体粒子に結合して用いられる。本発明の担体粒子としては、ラテックス粒子、カオリン、金コロイド、赤血球細胞、ゼラチン、リポソーム等が挙げられる。ラテックス粒子としては、凝集反応において一般に用いられているものが使用できる。ポリスチレン系ラテックス、ポリビニルトルエン系ラテックス、ポリメタクリレート系のラテックス粒子が公知である。好ましい粒子担体はポリスチレン系ラテックス粒子である。官能基を有するモノマーの共重合によって、ラテックス粒子表面に官能基を導入したラテックス

25

- 11 -

粒子を用いることもできる。たとえば、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{SO}_3$ 等の官能基を有するラテックス粒子が公知である。官能基を有するラテックス粒子には、結合パートナーを化学的に結合させることができる。

担体粒子の平均粒径は、例えばラテックス粒子の場合、 $0.5 \sim 20 \mu\text{m}$ が好ましい。平均粒径が $0.5 \mu\text{m}$ 以下、または $20 \mu\text{m}$ 以上であるとパールチェーンが形成されにくく好ましくない。担体粒子の平均粒径は、例えばラテックス粒子の場合、具体的には $2 \sim 10 \mu\text{m}$ 、さらに好ましくは $1 \sim 10 \mu\text{m}$ であり、最も好ましくは $2 \sim 5 \mu\text{m}$ である。また、誘電分極が大きい楕円形粒子を用いることにより、より小さい担体粒子を使用することもできる。

10 このように、公知のラテックス凝集比濁法における担体粒子が $0.05 \sim 0.6 \mu\text{m}$ であるのと比べ、本発明の方法においては $1 \mu\text{m}$ 以上の大きなサイズの粒子を利用することができる。電圧パルスを印加する工程の利用によって凝集反応が促進される結果、大きなサイズの粒子であっても短時間で十分な反応が進行するためである。担体粒子が大きいことは、以下のような利点につながる。まず、粒子を計測するためのアパーチャーサイズを大きくすることができる。その結果、アパーチャーが詰まりにくくなる。また、担体粒子が大きくなることによって、
15 体液に含まれる測定妨害物質との識別が容易になる。その結果、測定精度が向上する。

結合パートナーと粒子担体は、それぞれの素材に応じた方法によって結合させることができる。当業者は、両者の結合方法を適宜選択することができる。たとえばラテックス粒子には、抗原や抗体、あるいはそれらの断片などの蛋白質を物理吸着することができる。表面に官能基を有するラテックス粒子においては、当該官能基との共有結合が可能な置換基を化学的に結合させることができる。たとえば、 $-\text{COOH}$ を有するラテックスには、蛋白質の $-\text{NH}_2$ を結合させることが
20 できる。
25 結合パートナーを結合させた担体粒子は、必要に応じてブロッキングすること

- 12 -

ができる。具体的には、担体粒子表面を不活性蛋白質で処理することによって、担体粒子表面に対する非特異的な蛋白質の結合を防止することができる。不活性蛋白質としては、ウシ血清アルブミンや脱脂粉乳などを用いることができる。更に、担体粒子の分散性を向上させるために、分散媒に界面活性剤や糖類を加えることができる。また、微生物の繁殖を防ぐために、粒子担体に抗菌剤を添加することもできる。

本発明は、親和性物質と担体粒子を含む反応液に電圧パルスを印加する工程を含む。電界中に担体粒子を整列させ、凝集反応を行わせる方法は公知である（特開平 7-83928 号）。すなわち、親和性物質と担体粒子を含む反応液に電圧パルス

を印加することにより、担体粒子を電界に沿って整列させることができる。このとき、凝集阻止反応の原理を利用する場合には、親和性物質と担体粒子は、凝集試薬の共存下で整列させられる。凝集試薬は、担体粒子と測定対象親和性物質との接触の後に接触させることができる。あるいは予め測定対象親和性物質と凝集試薬を混合した後に担体粒子を添加することによって、3つの成分を同時に接触させることができる。

電圧パルスには交流成分、または直流成分を利用することができる。両者を任意に組み合わせることもできる。反応液は電気分解を起こしやすいので交流電圧が好ましい。交流電圧には、方形波、矩形波、あるいは正弦波等を用いることができる。反応液（試薬）のイオン強度により、交流電圧の電源周波数を任意に設定することができる。交流電圧は波高値で示したとき、5～50 V/mmの電解強度が得られるように印加する。電解強度が5 V/mmよりも小さいと担体のパールチェーン化が起こりにくく、したがって凝集反応の促進が不十分となる。電解強度が50 V/mmを超えると反応液の電気分解が起こりやすく、凝集反応の測定が困難となる。より好ましくは10～20 V/mmの電界強度が得られるように印加する。交流の周波数は10 KHz～10 MHzの周波数が好ましい。より好ましくは50 KHz～1 MHzの周波数である。

本発明において、電圧パルスとは通常、定常状態から振幅が遷移し、有限の時間だけ持続してもとの状態にもどる波または波形を有する電圧をいう。交流電圧は、代表的な電圧パルスである。交流電圧は電圧の平均値が0であるような時間の周期関数である。たとえば正弦波、矩形波、方形波、あるいはのこぎり波など
5 の有する電圧は明らかに振幅が周期的であり、交流電圧に含まれる。一般に、交流電圧においては、任意の1周期において、正電位側の面積と負電位側の面積は等しく、両者の合計は0となる。各面積は、横軸（電位差が0）と上側の曲線、あるいは下側の曲線によって規定される面積である。本発明においては、反応液
10 の電気分解を防ぐために、電圧パルスが印加される。したがって、反応液の電気分解が起こらない、あるいは起きたとしても実質的に反応に干渉しないレベルに抑制できる場合には、正電位と負電位の合計が0でない電圧パルスを用いることもできる。

本発明において、方形波、あるいは矩形波の電圧パルスは、正電位／電位差0
15 ／負電位を繰り返し、かつ正電位および負電位の少なくとも一方は、電圧が一定の状態を含む電源を言う。そして方形波、あるいは矩形波の、電位差が0の状態から次の0の状態に至る間の時間がパルス幅である。なお方形波とは、縦軸を電圧、横軸を時間とするグラフに電圧の変化を描いたときに、ほぼ四角形の形状となる電圧パルスを言う。四角形には、正方形と長方形が含まれる。これに対して
20 矩形波は、正方形を含まない長方形の形状の電圧パルスである。したがって、矩形波は方形波に含まれる。本発明において、好ましいパルス幅は、通常50 μ sec以下である。好ましいパルス幅として、0.1～10 μ secを例示することができる。

方形波あるいは矩形波を構成する電位差が0の状態の時間は、制限されない。
25 一般的には電位差が0となるのは、正電位と負電位の間の移行の瞬間である。しかし、電位差が0の状態がより長い時間継続するような電圧パルスを本発明に用

- 14 -

いることもできる。たとえば、 $0.1 \sim 10 \mu\text{sec}$ のパルス幅を有する正電位／負電位の繰り返しの間に、 $0.1 \sim 100 \mu\text{sec}$ の電位差が0の状態を含むことができる。

本発明においては、反応液に対して任意の方向から電圧パルスを印加することができる。たとえば、複数の異なる方向の電圧パルスを印加することもできる。具体的には、たとえば図6上に示すように2組の電極を組み合わせ、反応液に電圧パルスを印加することができる。あるいは、反応液に対して電極を移動させることによって、異なる方向の電圧パルスを与えることができる。たとえば、電極を回転させることによって、任意の角度の電圧パルスを与えることができる。

10 移動させる電極の数は、1組であってもよいし、2組以上の電極を移動させることもできる。

本発明において、直交する電場を与えることができる2組の電極を組み合わせ、場合に形成されるパールチェーンの構造を図6に示した。図6の例においては、2方向の電圧パルスを交互に印加すれば、担体粒子は電圧パルスが交差する領域

15 に収束する（図6下右）。あるいは電圧パルスの印加と分散を交互に行えば、電極3-3間の電圧パルスに沿ったパールチェーン（図6下中央）と、電極3'-3'間の電圧パルスに沿ったパールチェーン（図6下左）とを交互に形成する。このような立体的なパールチェーンの形成は、親和性物質間の反応を促進する。

本発明において、複数組の電極の配置は任意である。電極間の距離が短い場合には、形成されるパールチェーンが短くなる。一方電極の距離が長いと、印加される電圧が大きくなる。更に実際には、電極の配置によって反応空間の構造が左右される。そのため一般的な電極間の距離は、通常 $0.01 \text{ mm} \sim$ 数十 mm である。一般的な免疫学的粒子凝集反応においては、好ましくは、 $0.1 \text{ mm} \sim 5 \text{ mm}$ 、たとえば $0.5 \text{ mm} \sim 3 \text{ mm}$ の範囲で電極を配置することができる。

25 図5に、電極間の距離と、そのときの反応液の体積の例を示した。 $0.5 \sim 1 \text{ mm}$ の間隔で電極を配置し、セルの長さを $10 \text{ mm} \sim 20 \text{ mm}$ とすることによって、一般

- 15 -

的な免疫学的凝集反応の反応液量である2.5～20 μ Lの反応液を収容することができる。また複数組の電極を利用する場合には、各組み合わせの間で、電極の距離と高さとを一致させることが好ましい。

モノクローナル抗体を感作した担体粒子の凝集を利用した、抗原性物質の検出方法が公知である。モノクローナル抗体は、通常、抗原上の単一のエピトープを認識する。そのため、担体粒子を凝集させるためには、一般に、複数種のモノクローナル抗体を利用する必要がある。しかしモノクローナル抗体を使用する限り、原理上、抗原1分子に結合しうる抗体の数（すなわち担体粒子の数）は、利用したモノクローナル抗体の種類を越えることはできない。このことが、モノクローナル抗体を使った担体粒子の凝集反応に基づく分析方法の検出感度を制限する原因の1つとなっている。本発明に基づいて、複数方向からの電圧パルスを印加することができれば、印加方向の変化によって、担体粒子と抗原分子との接触の機会が増え、その結果、検出感度の向上が期待できる。

スライドガラスを利用した公知の方法においては、電圧パルスを印加する方向は制限されていた。また顕微鏡などを利用した観察方法を利用する限り、立体的な反応空間を利用することはできなかった。これに対して本発明では、凝集していない粒子あるいは凝集した粒子の三次元情報を測定することによって凝集率を解析するため、反応空間の形状が制限されない。親和性物質の結合を介して結合された2以上の粒子の集合体を、凝集塊 (aggregate) と言う。凝集塊を構成する粒子の数は制限されない。複数の粒子は、直鎖状に結合することもあるし、格子状 (マトリクス状) に結合することもある。どのような形を形成していても、複数の粒子が結合された状態にあれば、それは凝集塊である。したがって、複数の異なる方向からの電圧パルスの印加を実現したことは、本発明によって実現することができる大きな利点である。

一般に、反応系中の担体粒子の濃度が高いほどパールチェーンが形成されやすいので凝集が促進される。しかし一方で、担体粒子の濃度の上昇に伴って、生物

- 16 -

学的特異的反応性物質が存在しない場合に再分散したときの担体粒子の凝集率

(バックグラウンド)が大きくなる傾向があった。2次元の情報に基づいて凝集粒子を観察してした公知の方法(特開平7-83928号)においては、担体粒子濃度が高いほど、凝集していない粒子を誤って凝集粒子として捉えてしまう可能性が高まる。粒子濃度が高い場合には、粒子が接近するため、単なる粒子の重なりと、凝集によって形成された粒子塊との識別が困難となるのである。したがって凝集塊を特異的に識別するためには、粒子濃度を低く保つ必要がある。具体的には、特開平7-83928号に開示された反応系中の担体粒子の濃度は、例えばラテックス粒子の場合、好ましくは0.01~1重量%、より好ましくは

5 性が高まる。粒子濃度が高い場合には、粒子が接近するため、単なる粒子の重なりと、凝集によって形成された粒子塊との識別が困難となるのである。したがって凝集塊を特異的に識別するためには、粒子濃度を低く保つ必要がある。具体的には、特開平7-83928号に開示された反応系中の担体粒子の濃度は、例えばラテックス粒子の場合、好ましくは0.01~1重量%、より好ましくは
10 0.025~0.5重量%、最も好ましい濃度は0.05~0.1重量%である。このような粒子濃度は、パールチェーン化においては、必ずしも最適な条件とは言えない。すなわち2次元の情報に基づいて凝集塊を計数する手法においては、粒子濃度を犠牲にすることによって、凝集塊の特異的な識別を実現していた。

本発明は、三次元の情報に基づいて凝集粒子が計測されるため、粒子濃度とは
15 無関係に凝集塊を特異的に識別することができる。その結果、パールチェーンの形成に最適な条件を与えることができる。すなわち、測定対象親和性物質と結合活性を有する結合パートナーとのバランスを考慮して担体粒子の濃度を決定することができる。たとえ高い担体粒子濃度が選択されても、凝集塊は特異的に検出される。本発明においては、通常、反応系中の担体粒子の濃度は、例えばラテックス粒子の場合、好ましくは0.01~5重量%、より好ましくは0.1~2重量%である。この濃度範囲は、2次元の情報に基づく方法の、倍~10倍である。最適な担体粒子の濃度は、担体粒子の大きさや測定対象親和性物質の測定感度等に合わせて適宜調節することができる。

本発明において、反応液には凝集反応を促進する塩を添加することができる。
25 たとえば、10mM以上の比較的高い濃度で塩を添加することにより、凝集反応を促進することができる。ただし塩の濃度が反応系中に600mM以上の濃度で存在

- 17 -

すると反応液の電気分解が起こり易くなるので好ましくない。より好ましい塩の濃度は10～300mM、最も好ましい塩の濃度は25～150mMである。生体試料自身が凝集反応を促進する塩を含有している可能性がある場合には、反応液中の最終塩濃度が上記の範囲に入るように試薬の塩濃度を調整すると良い。なお電
5 圧パルスとして直流成分を用いる場合では約6mMの塩濃度の反応液でも電気分解が起こるため、塩の存在下では生物学的特異的凝集反応の測定は困難である。

本発明における塩は、生物学的特異的凝集反応を促進するものの中から選択され得る。例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム、塩化アンモニウムが挙げられるがこれに限定されるものではない。モル電気
10 伝導度が10mM、25℃の水溶液において100cm²/(Ω・mol)以上の値を示す塩は、本発明に用いる塩として好ましい。より具体的には、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、および塩化アンモニウム等を好ましい塩として示すことができる。

本発明において、親和性物質を含む検体は制限されない。すなわち、測定対象である親和性物質を含む任意の試料を検体として利用することができる。たとえ
15 ば、血液試料、咽頭などの局所から採取された試料、唾液、喀痰、尿、あるいは便は代表的な生体試料である。その他、生体から採取されるあらゆる生体材料は、生体物質測定用の検体として本発明に利用することができる。更に、これらの生体試料を培養することによって得ることができる培養物も、本発明の検体として利用することができる。生体材料は、そのまま、あるいは必要に応じて処理した
20 後に、検体とすることができる。たとえば、生体材料は分画、希釈、溶解、抽出などの処理を経て、検体とすることができる。

本発明は、粒子の三次元情報を測定する工程を含む。そのため、検体が固形成分を含む場合には、除去や溶解によって、固形成分を予め取り除くことが好ましい。固形成分は、ろ過や遠心分離によって除去することができる。ただし、粒径などの情報に基づいて、試料由来の固形成分のシグナルを、担体粒子のシグナル
25 と明瞭に識別できる場合には、固形成分の除去は必須ではない。

- 18 -

本発明において検体は原液でもよく、又は自動希釈して測定に使用される。希釈倍率は任意に設定することが可能である。反応に必要な試薬が複数種類となるときには、2試薬以上を順次に添加することも可能である。

ここで言う2試薬を構成する試薬としては、たとえば以下のような試薬を示すことができる。

本発明において、非特異反応の原因となる物質を、予め分解、および／または吸収するための試薬を用いることができる。このような試薬は、非特異抑制剤を含む試薬として有用である。非特異抑制剤を含む試薬は、担体粒子を含む試薬と組み合わせられて、2試薬を構成する。非特異抑制剤を含む試薬は、たとえば、予め検体と混合することすることができる。非特異抑制剤は、例えば、従来周知のものを使用することができる。

イムノアッセイにおいて、非特異反応の原因となるさまざまな物質が試料中に含まれることが明らかにされている。たとえば、リウマチ因子などのグロブリン類は、イムノアッセイを構成する免疫反応に干渉することがある。グロブリン類のイムノアッセイへの干渉を防止するために非特異抑制剤が用いられる。たとえば、グロブリン類を認識する抗体によって、その非特異作用を吸収することができる。リウマチ因子はIgGやIgM由来のグロブリンである。したがって、抗ヒトIgG抗体、あるいは抗ヒトIgM抗体を使用して、リウマチ因子を吸収することができる。また、非特異原因物質の分解によって干渉を防ぐ方法も公知である。具体的には、グロブリン類を還元によって分解し、その干渉作用を抑制できることが知られている。グロブリン類は、ジチオスレイトール、あるいは2-メルカプトエタノールなどによって還元される。

また、異なる結合活性を有する結合パートナーを結合した担体粒子を含む試薬を2種類以上組み合わせることができる。このような構成によって、異なる種類の測定対象親和性物質を同時に測定することができる。各試薬は、それぞれ個別に添加することができる。あるいは、予め複数の試薬を混合した後に、検体と混

合することもできる。

検体と試薬は電圧を印加する前に予め混合しておくことが望ましい。攪拌子を使って物理的に両者を混合することができる。あるいは電氣的な方法によって、両者を混合することもできる。電氣的な手法としては、異なる方向の電圧パルス
5 の断続的な印加によって、担体粒子の位置を物理的に動かす方法を例示することができる。

本発明は、次の工程を含む親和性物質の測定方法に関する。

- (1)測定対象親和性物質との結合活性を有する結合パートナーを結合した担体粒子と、測定対象親和性物質とを混合し、電圧パルスを印加して前記担体粒子
10 を電界に沿って整列させる工程
- (2)測定対象である親和性物質との結合によって形成された担体粒子の凝集塊、および測定対象である親和性物質と結合せず凝集塊を形成しなかった担体粒子のいずれかまたは両方を、その三次元情報を指標として計数する工程、および
- 15 (3)凝集塊の形成レベル、および凝集塊を形成しなかった担体粒子のレベルのいずれか、または両方に基づいて測定対象物質のレベルを決定する工程

本発明の測定方法を構成する各工程を以下に具体的に説明する。

- 混合された反応液は次に電極を介した槽に移動して、電圧パルスを印加する。電場をかけると担体粒子は誘電分極を起こして静電的に引き合い直鎖状に並ぶ。
- 20 この現象は、パールチェイン化と呼ばれている。その後電場を停止すると直鎖に並んでいた担体粒子は瞬時に再分散する。一方パールチェイン化の際に生物的特異的反応物質が存在すると、生物的特異的反応に関与した担体粒子は電場を停止後も分散せずに凝集塊を形成したままの状態が存在する。これらの生物的特異的凝集反応に関与している凝集粒子及び／又は関与しなかった分散した担体粒子を
25 測定することにより生物的特異的反応物質の存在を検出又は測定することができる。

- 20 -

本発明の測定方法は、測定対象である親和性物質との結合によって形成された担体粒子の凝集塊、および測定対象である親和性物質と結合せず凝集塊を形成しなかった担体粒子のいずれかまたは両方を、その三次元情報を指標として計数することを特徴とする。本発明において、粒子は電場を停止後に測定することができる。あるいは電場に置かれた粒子を、電場を停止することなく測定することもできる。たとえば、電場に置かれた粒子は、電場の中から取り出すことによって計数することができる。更に、粒子の計数前に、粒子を分散させる工程を実施することができる。計数前の分散工程によって、非特異的な要因によって凝集した粒子を分散させることができる。その結果、測定精度の向上が期待できる。粒子は、攪拌や反応液の希釈によって分散させられる。

本発明においては、粒子は、三次元情報を指標として計数される。本発明において、三次元情報を指標とする計数とは、粒子および／または凝集塊の三次元情報を測定し、その結果に基づいて粒子および／または凝集塊を計数することを言う。顕微鏡画像を解析する公知の方法は、二次元情報に基づいて凝集のレベルを決定している。したがって、三次元情報を指標とする本発明と公知の方法とは、明確に区別される。

三次元情報を測定するための方法は限定されない。また、本発明における計数とは、粒子および／または凝集塊の数を求めることを言う。粒子および／または凝集塊の数は、単に数のみを測定することもできる。あるいは凝集した粒子を、凝集していない粒子と区別して測定することもできる。更に、凝集した粒子については、凝集した粒子の数ごとに、その凝集塊の数を測定することもできる。三次元情報を指標として粒子を計数するためのいくつかの方法が公知である。

本発明に利用することができる粒子の計数方法は、物理的な原理に基づく測定方法が有利である。本発明において物理的な測定方法とは、粒子または凝集塊に固有の物理的な情報を評価することができる測定方法を言う。粒子または凝集塊に固有の物理的な情報は、真の測定結果と言い換えることもできる。これに対し

て画像情報から取得される二次元情報を解析する方法は、実際には凝集していない粒子の重なりを凝集塊として検出してしまう。このような検出結果は、粒子に固有の物理的な情報とは言えない。

粒子または凝集塊を物理的に測定するには、フローシステムの利用が有利である。
5 フローシステムは、微細なフローセル中を通過する粒子の物理的な情報を解析することができるシステムである。フローシステムを利用することにより、容易に物理的な測定を実施することができる。すなわち本発明における物理的な測定とは、フローシステムによって粒子および凝集塊のいずれかまたは両方の三次元情報を測定し計数する工程を含む。三次元情報を指標として粒子を物理的に計
10 数するための方法として、たとえば、コールター原理またはレーザー回析散乱法を示すことができる。

コールター原理 (USPA2656508, 1953年) とは、アパーチャー (細孔) の両側に電極を置き、アパーチャー内を通過する粒子による電気抵抗の変化に基づいて粒子の体積を検出する解析方法である。電解液を通して両電極間に微小電流を流したとき、電解液中に懸濁した粒子が吸引されてアパーチャーを通過すると、粒子
15 体積に相当する電解液が粒子によって置換される。その結果、両電極間の電気抵抗に変化を生じるので、この変化を測定することにより、粒子の計数とサイズ (体積) を測定することができる。体積を検出する方法として静電容量法があるが、実用化されているものは電気抵抗法がほとんどである。

20 アパーチャーサイズは、解析対象となる粒子に合わせて適宜調節することができる。一般的な免疫学的な粒子凝集反応に用いられる担体粒子の凝集を検出する場合、アパーチャーサイズとしては、通常 $30 \sim 1000 \mu\text{m}$ 、好ましくは $50 \sim 200 \mu\text{m}$ を示すことができる。

アパーチャーサイズは、担体粒子の平均粒径に対して数倍～数100倍、たとえば数倍～100倍、好ましくは5倍～50倍とするのが有利である。この場合、
25 体積に比例したシグナルが検出でき、精度のよい高感度な測定が実現できる。粒

- 22 -

子径に対してアパーチャーサイズの倍率は小さい方が感度はよくなるが、小さすぎると粒子が詰まりやすくなり、大きすぎると粒子の検出感度が低下するので好ましくない。

より具体的には、たとえば粒子径が $1 \sim 5 \mu\text{m}$ 、特に $2 \sim 3 \mu\text{m}$ の担体粒子を計
5 数する場合、アパーチャーサイズは $30 \sim 100 \mu\text{m}$ 、好ましくは $50 \sim 80 \mu\text{m}$ 、
たとえば $65 \sim 75 \mu\text{m}$ の範囲から選択することができる。 $2 \sim 3 \mu\text{m}$ の担体粒子
は、本発明による親和性物質の測定方法において、特に好ましい粒子サイズとし
て挙げることができる。すなわち本発明は、以下の工程を含む親和性物質の測定
方法を提供する。

10 (1)測定対象親和性物質との結合活性を有する結合パートナーを結合した平均粒
径 $2 \sim 3 \mu\text{m}$ を有する担体粒子と、測定対象親和性物質とを混合し、電圧パ
ルスを印加する工程、または

(1')測定対象親和性物質との結合活性を有する結合パートナーを結合した平均
粒径 $2 \sim 3 \mu\text{m}$ を有する担体粒子と、測定対象親和性物質とを、凝集試薬
15 成分と混合し、電圧パルスを印加する工程であって、前記担体粒子は凝集
試薬によって凝集し、かつ測定対象親和性物質によってその凝集は阻害さ
れる工程

(2)工程(1)の後に、測定対象である親和性物質との結合によって形成された担
体粒子の凝集塊、および測定対象である親和性物質と結合せず凝集塊を形成
20 しなかった担体粒子のいずれかまたは両方を、 $50 \sim 80 \mu\text{m}$ のアパーチャ
ーサイズを有するコールター原理によって、その三次元情報を指標として計
数する工程、または

(2')工程(1')の後に、凝集試薬との結合によって形成された担体粒子の凝集塊、
および測定対象である親和性物質との結合によって凝集を阻害された担体
25 粒子のいずれかまたは両方を、 $50 \sim 80 \mu\text{m}$ のアパーチャーサイズを有
するコールター原理によって、その三次元情報を指標として計数する工程、

- 23 -

および

(3)工程(2)または(2')の後に、凝集塊の形成レベル、および凝集塊を形成しなかった担体粒子のレベルのいずれか、または両方に基づいて測定対象物質のレベルを決定する工程

- 5 一般にアパーチャーサイズが小さい方が、非凝集粒子をより正確に計数することができる。反対にアパーチャーサイズを大きくすることによって、凝集粒子がアパーチャーに詰まりにくくなる。アパーチャーの詰まりは解析効率の低下の原因となる。詰まる頻度を低くすることが、解析効率の向上につながる。たとえば、凝集粒子が多量に生成することが予測される場合には、アパーチャーサイズを大
- 10 きめに設定することによって、アパーチャーの詰まりを防止することができる。あるいは、粒子径の小さい担体粒子を用いることで同様の効果を期待することができる。更に、試料の希釈によって凝集粒子の割合を低下させ、アパーチャーの詰まりを防止することもできる。通常は、期待される検出感度、予想される検出対象物質の濃度、そして機器構成（特にアパーチャーサイズ）に応じて、それぞ
- 15 れ適切な条件を選択すればよい。

このようにして凝集粒子を計数することによって、凝集粒子の割合を知ることができる。凝集粒子の割合とは、計数した全粒子に占める凝集した粒子の割合を言う。また凝集粒子の割合を、凝集率(aggligation rate)と言う。更に、予め濃度がわかっている標準試料について、凝集率を求め、両者の関係をグラフにプロ

20 ットすることによって、標準曲線を得ることができる。これに対して、検体の凝集率を照合すれば、検体に含まれる測定対象親和性物質の濃度を明らかにすることができる。

あるいは前記標準曲線を回帰式として表すこともできる。回帰式が得られれば、凝集率を回帰式に代入することによって、測定対象親和性物質の濃度を算出する

25 こともできる。

一方レーザー回析散乱法とは、粒子にレーザーを照射した際に生じる揺らぎを

検出することにより粒子の計数と平均径を測定するものである。いずれの場合も、測定精度を高めるために、粒子の誤測定を抑制する目的として、反応粒子を希釈、超音波の印加又は／及びシースフォロー方式などを用いることが好ましい。

その他にも以下のような方法を、粒子体積の測定方法として示すことができる。

- 5 遠心沈降法：液中における粒子の沈降速度と粒径の関係を示すストークスの式により粒径分布を測定する方法。（光透過式遠心沈降法では、ストークスの法則を適用し、同じ比重の粒子ならば大粒のものの方が小粒のものよりも早く沈降することを利用する。その時の粒子濃度を光透過による濁度変化として解析し、粒度分布を求めることができる。）
- 10 キャピラリー方式：キャピラリー中を流れる粘性流体のレイノルズ数が小さい場合、そこにはポアズイユの流体が発生する。この流れはキャピラリー中央ほど速く、管壁ほど遅いため、大きな粒子は平均的に速い流束中を、小さい粒子は平均的に遅い流束中を流れて行くことになる。つまり粒子は一定長のキャピラリー中を流れる際、この移動速度の違いにより、サイズ別に分離され検出される。
- 15 三次元的画像解析：異なる方向から撮影した複数の画像情報を解析し、粒子の三次元情報を求めることができる。あるいはx y平面の画像情報をz軸方向へスキャンすることにより、粒子の三次元情報を求めることができる。

本発明の測定方法は、三次元情報を指標として凝集した（またはしなかった）担体粒子が計数される。計数の結果によって、測定対象である親和性物質が定性的に、または定量的に測定される。定性的な測定においては、凝集粒子の存在は、
20 測定対象である親和性物質の存在を意味する。あるいは凝集阻止反応の場合には、凝集の阻止が検出されたときに、測定対象の存在が証明される。

また定量的な測定においては、凝集のレベルを測定対象である親和性物質の量と関連付けることができる。より具体的には、予め親和性物質の量が明らかな試料について本発明の測定方法を行い、三次元情報に基づく凝集粒子の検出結果と
25 親和性物質の量の関係を明らかにしておく。次に、試料について同様の測定を行

- 25 -

い、堆積に基づく凝集粒子の検出結果から、親和性物質の量を明らかにすることができる。凝集阻止反応の場合であっても、同様にして定量的な測定は可能である。

粒子および／または凝集塊の計数方法としては、一定の粒子数をカウントする
5 手段においては、2個以上に凝集した粒子数／総粒子数や単粒子／総粒子数など
目的に合わせて演算式を選ぶことができる。総粒子数とは、ある計測時間内に計
測された全ての粒子の数であっても良いし、反応液の全量を解析の対象とする場
合には、文字通り、反応液に含まれる粒子の総数とすることもできる。反応液に
含まれる粒子の総数は、反応液の全容量が明らかな場合には、その一部を計数す
10 ることによって、近似的に算出することもできる。

あるいは、電気抵抗法やレーザー回析散乱法などによって、一定時間あたりに
検出された粒子および／または凝集塊の数に基づいて、親和性物質を検出または
測定することができる。つまり、凝集反応により単粒子は凝集して凝集塊を形成
することから、時間あたりに計数される粒子数が少なくなる。または、所定数の
15 粒子および／または凝集塊を計数するに要する時間を指標とすることもできる。
このような計数方法を本発明に適用する場合には、それぞれ粒子および／または
凝集塊の数と、親和性物質の量との間の関係を、回帰式として表すことができる。

抗体が感作された粒子は、抗原の濃度に応じて、2個以上の粒子からなる凝集
塊の割合が多くなる。そして2個以上に凝集した粒子数／総粒子数で表される凝
20 集率は、1.00（100％）に収束する。

コールター原理にしろレーザー回析散乱法にしろ、粒子の三次元情報を計測す
る方法は、二次元的な画像データを解析する方法と比較して、簡単な機器構成に
よって、高精度な解析が期待できる。既に述べたように、二次元的な画像データ
の解析においては、反応液の容積が制限される。これに対して三次元情報を計測
25 する方法は、フロー式の解析手法を応用できるため、反応液の容積は制限されな
い。また反応空間の物理的な形状も制限されない。これらの理由により、機器構

成はシンプルとなる。加えて、反応液量を自由に設定できることが、再現性や検出感度の向上に貢献する。

あるいは本発明は、次の工程を含む、親和性物質の測定方法を提供する。

5 (1')測定対象親和性物質との結合活性を有する結合パートナーを結合した担体粒子と、測定対象親和性物質とを、凝集試薬成分と混合し、電圧パルスを印加して前記担体粒子を電界に沿って整列させる工程であって、前記担体粒子は凝集試薬によって凝集し、かつ測定対象親和性物質によってその凝集は阻害される工程

10 (2')工程(1')の後に、凝集試薬との結合によって形成された担体粒子の凝集塊、および測定対象である親和性物質との結合によって凝集を阻害された担体粒子のいずれかまたは両方を、その三次元情報を指標として計数する工程、および

15 (3)工程(2')の後に、凝集塊の形成レベル、および凝集塊を形成しなかった担体粒子のレベルのいずれか、または両方に基づいて測定対象物質のレベルを決定する工程

凝集試薬を利用する、凝集阻止反応に基づく免疫学的粒子凝集反応法の原理は既に述べた。上記工程によって、免疫学的粒子凝集反応に本発明を応用することができる。上記工程を構成する電圧パルスの印加や凝集塊の形成レベル、あるいは凝集塊を形成しなかった担体粒子のレベルの解析は、先に具体的に述べたような方法によって実施することができる。

20 なお凝集阻止反応の原理に基づいて本発明を実施する場合には、2個以上の粒子が凝集した凝集塊がより多く生成される条件を選択することが望ましい。あるいは、単粒子／総粒子数を指標として凝集レベルを評価する方法が好ましい。凝集阻止反応の原理に基づく場合には、このような演算式を利用したほうが、2個以上

25 以上に凝集した粒子数／総粒子数の演算式に基づく解析よりも、高い感度を期待できる。

- 27 -

加えて本発明は、上記測定方法を実施するための装置を提供する。すなわち本発明は、次の手段を含む、親和性物質の測定装置に関する。

(a) 測定対象親和性物質との結合活性を有する結合パートナーを結合した担体粒子と、測定対象親和性物質とを保持する空間、

5 (b) 前記空間に保持された担体粒子に電圧パルスを印加するための電極、および

(c) 前記空間に保持された担体粒子の凝集によって生じた凝集塊、および凝集しなかった前記担体粒子のいずれかまたは両方を、その三次元情報を指標として計数する手段

10 本発明において、(a) 測定対象親和性物質との結合活性を有する結合パートナーを結合した担体粒子と、測定対象親和性物質とを保持する空間には、反応液を保持するための任意の空間を利用することができる。微量の試料を反応させるためには、小容量の空間であることが有利である。たとえば $1\ \mu\text{L}$ ~ $10\ \text{mL}$ 、好ましくは 10 ~ $500\ \mu\text{L}$ 程度の空間を利用することができる。この空間は、必要に応じて、試料や試薬の供給手段、あるいは後に述べる担体粒子の計測手段を装備す
15 ることもできる。

次に本発明における(b) 前記空間に保持された担体粒子に電圧パルスを印加するための電極について説明する。担体粒子を電場に整列されるための電極は、たとえば先に記載した先行技術文献においても利用されている。これら公知の電極
20 を、本発明に利用することができる。本発明の装置には、電極に電圧を供給するための電源を装備することができる。

本発明の装置における電圧パルスを印加するための電極は、少なくとも1組(2つ)の電極で構成される。複数の異なる方向の電圧パルスを与えるために、3以上の電極を備えることもできる。たとえば、3つの電極A、B、Cを配置し、
25 A-B間、B-C間、およびA-C間の3つの方向の電圧パルスを印加することができる。この他、2組(4つ)の電極を配置し、直交する電圧パルスを印加す

することもできる（図6）。

更に、異なる方向の電圧パルスを印加するために、電極を駆動する機構を備えることができる。たとえば、反応液の中で電極を回転させることにより、複数の異なる方向から電圧パルスを印加することができる。異なる方向から電圧パルスを印加するとき、印加の方向は任意の角度とすることができる。

更に本発明の装置は、(c) 前記空間に保持された担体粒子の凝集によって生じた凝集塊、および凝集しなかった前記担体粒子のいずれかまたは両方を、その三次元情報を指標として計数する手段を含む。該計数手段は、前記空間に装備することができる。あるいは前記空間に保持された反応液を前記空間から取り出して計数手段に導入した後に、計数することもできる。

三次元情報を指標として凝集した、またはしなかった担体粒子を計数する手段としては、コールター原理、あるいはレーザー回析散乱法を利用した計測手段を利用することができる。コールター原理のためには、たとえば前記空間内の反応液を、コールター原理のための電極を備えたアパーチャーに導入して、必要な解析が行われる。アパーチャーのサイズは、先に述べたような基準に基づいて、適宜調節することができる。試薬に用いる粒子径、あるいは予測される凝集粒子の割合に応じて、異なるサイズを有する複数のアパーチャーを切り替えて利用する機構を採用することもできる。たとえば、本発明の装置は、複数のアパーチャーに反応液を導くための流路切り替え機構を備えることができる。更に、試薬の種類や、予測される凝集粒子の割合などに基づいて、流路を自動的に選択する機構を組み合わせることもできる。あるいは、本発明の装置は、アパーチャーサイズの切り替えによって、自動的に検出感度を調節する機構を備えることができる。検出感度の調節機構として、たとえば、まず大き目のアパーチャーサイズで解析し、凝集粒子の割合が小さいと予測された場合に、より小さいアパーチャーに切り替える機構を示すことができる。レーザー回析散乱法を利用する場合も同様に、解析のための光学セルに反応液を導入して解析すればよい。

- 29 -

本発明において、電場においてパールチェーン化された担体粒子は、必要に応じて再分散させた後に、三次元情報を取得することができる。本発明の装置には、担体粒子の再分散のための機構を装備することができる。担体粒子は、希釈や超音波処理によって再分散することができる。

- 5 本発明の装置を構成する上記(a)-(c)の要素は、1つの連続する流路内に配置することができる。あるいは、各要素を不連続な空間として構成し、各要素の間を反応液を移動させることによって、本発明の測定方法を実施することもできる。

本発明の装置には、上記測定方法を実施するための付加的な機構を組み合わせることができる。本発明の装置に組み合わせることができる付加的な機構を、以

- 10 下に例示する。

試料の分取機構

測定結果の表示機構

試料の希釈機構

15

測定結果の印刷機構

測定結果の記録機構

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

図面の簡単な説明

- 20 図1(A)は、本発明に基づく装置の構成を示す図である。また図1(B)は、本発明に基づく装置を構成するパルス印加槽の断面を示す図である。

図中の符号はそれぞれ次の要素を示す。

1：分注＋攪拌手段

4：希釈手段

2：反応槽

5：粒度分布測定手段

- 25 3：電極（パルス印加手段）

図2は、本発明に基づく親和性物質の測定方法の測定原理を示す図である。

図中の符号はそれぞれ次の要素を示す。

- 30 100：ラテックス粒子

101：抗体

- 30 -

102 : 抗原

104 : 反応槽

3 : 電極

図 3 は、本発明に基づく親和性物質の測定方法を実施するための具体的な機器

5 構成を示す図である。

図中の符号はそれぞれ次の要素を示す。

1 : 分注+攪拌ユニット

7 : シースフロー

2 : パルス印加ユニット (3a、3b)

15

8 : 電極 (コールターカウンター)

3a : 電極 (パルス印加)

9 : ポンプ

10 3b : パルス電源ユニット

10 : 廃液

4 : 希釈ユニット

11 : シース液

5 : 粒度分布測定ユニット

12 : 希釈液 (洗浄液)

6 : アパーチャー

20

13 : コンピュータユニット

図 4 は、図 3 の構成を有する測定装置によって本発明の測定方法を実施したときに得られた粒度分布の測定結果を示す図である。図中、縦軸は粒度分布 (%) を、横軸は粒子径 (μm) を示す。

図 5 は、複数組の電極を配置した場合の、電極の配置と反応空間の体積の例を示す図である。

図 6 は、図 5 のような配置の電極で電圧を印加したときに形成される、パールチェーンの構造の例を示す図である。

図中の符号はそれぞれ次の要素を示す。

3 : 電極 (第 1 の電極組)

30 3' : 電極 (第 2 の電極組)

100 : ラテックス粒子

図 7 は、三次元情報に基く本発明の測定方法と、二次元情報を観測する公知の測定方法による測定方法の比較結果を示す図である。図中、縦軸は凝集率 (P/T%) を、横軸は AFP 濃度 (ng/mL) を示す。

- 31 -

図8は、パールチェーン化による反応と3次元情報に基き測定した本発明による方法の結果を示す図である。図中の縦軸は凝集率 (P/T%) を、横軸はCEA濃度 (ng/mL) を示す。

図9は、37℃20分間のインキュベーションによる反応と3次元情報に基き測定した公知の方法の結果を示す図である。図中の縦軸は凝集率 (P/T%) を、横軸はCEA濃度 (ng/mL) を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、図面に基づいて本発明を詳細に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

1. 本発明の測定装置による測定例：

図1 (A) は、本発明の装置の構成を示す図である。

この装置は、検体と試薬1 (緩衝液) を分注して混合し、更に試薬2 (ラテックス試薬) を分注して混合し、反応液を調製するための分注・攪拌槽を備える。パルス印加槽2に反応液を移動させ、電極3を介してパルス電圧を数秒から数十秒間印加して、パールチェーン化させる。反応液はパールチェーン化された後、希釈 (希釈槽4) され、粒度分布を測定する。

図1 (B) は、パルス印加槽の断面を示す図である。電極間の距離は0.5mm、電極の厚さは0.03mm、電極の長さは20mmである。

図2は、図1の装置を使用して測定される生物学的特異的反応の測定原理を示す図である。直径が2 μ mのラテックス粒子100に、測定の対象となる物質である抗体101を結合させたラテックス試薬と、緩衝液で希釈された検体102とを混合して反応液とする。ラテックス粒子への抗体や抗原などの結合は、周知の技術で行うことができ、疎水結合もしくは化学結合で結合されている。検体は、血液、尿などの体液、大気、土壌や河川などからの抽出物が使用される。

図3に基づいて装置の具体例を示す。分注+攪拌ユニット1により、血清検体1

- 32 -

μLとグリシン緩衝液10 μLを分取し、更に3 μmラテックス粒子にAFP抗体を感作したラテックス試薬5 μLを採取して混和する。この反応液を電極3aを介した反応槽に送り、パルス電源3bから交流電圧（100KHz, 20V/mm）を30秒間印加して、ラテックス粒子をパールチェーン化する。この後、反応液は希釈槽に移動し、希釈液1
5 2を1mL添加して希釈される。ここで希釈槽に超音波を1秒間かけることにより、抗原抗体反応に関与していない粒子を完全に再分散させる。この反応液の粒度分布測定ユニット5に送り、シースフローシステム7からアパーチャー6を通過した際に電極8により検出される信号からラテックス粒子の粒度分布を測定すると図4に示すような粒度分布が得られ、ラテックス粒子の凝集率（AR）を、以下の式により
10 りして算出し、予めAFP標準品を同様に測定して得られた検量線からAFP濃度を測定することができる。

$$〔式1〕 AR = (2 \text{ 個以上に凝集した粒子数}) / (\text{総粒子数}) \times 100 (\%)$$

各ユニットはコンピュータユニット13により自動制御され作動して測定が行われ、測定結果はディスプレイに表示されるというものである。

15

2. 本発明の測定方法（三次元情報）と公知の測定方法（二次元情報）の比較：
抗ヒトAFP抗体感作ラテックス試薬の調製方法

0.07mg/mLの抗ヒトAFP抗体（IgG）を含むグリシン緩衝液1.0mLに1.0%のφ3 μmラテックス（ポリサイエンス社）を懸濁させたグリシン緩衝液を加え、室温で2時間攪拌した後、感作したラテックス懸濁液を遠心分離（10000rpm、10分）して上清を除去した。沈殿を1.0%牛血清アルブミン-グリシン緩衝液に懸濁させ、37℃で1時間インキュベーションした後、再び遠心分離（10000rpm、10分）して上清を除去した。沈殿を0.2%牛血清アルブミン、10%ショ糖、50mM NaCl、0.09% Na₂S₂O₃を含むグリシン緩衝液に懸濁させ、抗ヒトAFP抗体感作ラテックス試薬を調製
25 した。この試薬を用いて、以下の3とおりの測定方法を実施した。

本法（1）

- 33 -

抗ヒトAFP抗体感作ラテックス試薬とAFP標準品（キャリブレーター）を用いて、交流電圧（100KHz、12V/mm、方形波）を40秒間印加してパールチェーン化した後、直ちに電源を切り、コールターカウンターによりラテックス粒子を計数した。2個以上に凝集した粒子数(P)と総粒子数(T)との比から凝集率を測定した。

5 本法（2）

抗ヒトAFP抗体感作ラテックス試薬とAFP標準品（キャリブレーター）を用いて、交流電圧（100KHz、12V/mm、方形波）を40秒間印加してパールチェーン化した後、直ちに電源を切り20秒間放置して特異的凝集反応に関与していないラテックス粒子を再分散させた。パールチェーン化及び再分散の工程を2回繰り返した後、本法
10 （1）と同様にコールターカウンターによりラテックス粒子の計数を行って凝集率を測定した。

比較例

抗ヒトAFP抗体感作ラテックス試薬とAFP標準品（キャリブレーター）を用いて、交流電圧（100KHz、12V/mm、方形波）を40秒間印加してパールチェーン化した後、
15 直ちに電源を切り40秒間放置して特異的凝集反応に関与していないラテックス粒子を再分散させた。反応液を顕微鏡で観察し、得られた顕微鏡映像をCCDカメラを介してコンピュータ入力して二次元画像解析を行い、2個以上に凝集した粒子数(P)と総粒子数(T)との比から凝集率を測定した。

結果

20 測定結果を表1および図7に示した。二次元画像解析を利用する公知の測定方法では、凝集率が約10%に収束した。その結果、特に低濃度（0.001～0.01 ng/mL）における凝集率の変化がわずかしき得られなかった。低濃度域では粒子の重なりの影響により、実際に凝集していない粒子を誤って凝集粒子と判定されることによる誤差の影響が大きいことが推測された。これに対して、本発明に
25 基づく、電気抵抗法を用いた三次元解析では、低濃度域でもほぼ直線的な凝集率の低下が観察された。その結果、二次元解析法よりも約10倍の高感度化が確認

- 34 -

できた。すなわち、本発明の方法においては、抗原(AFP)濃度0.001~1000 ng/mLにわたって、直線的な凝集率の変化が観察された。特に、繰り返しパールチェーン化することにより、特に0.1~100 ng/mLの濃度範囲において更に高感度化された。

表 1

AFP (ng/mL)	凝集率 (%)		
	比較例	本法 (1)	本法 (2)
0.001	0.0	4.9	6.0
0.005	11.7	9.6	12.5
0.01	13.4	11.8	16.0
0.1	19.9	20.3	26.4
1	30.0	30.2	38.0
10	44.1	43.8	50.4
100	58.3	57.8	62.4
1000	73.6	72.6	74.8

実施例 2 粒子測定とアパーチャー口径の関係

(1) 抗CEA抗体感作ラテックス試薬 (試薬2) の調製

0.1mgの抗ヒトCEA抗体 (ダコ社製) を1mLのグリシン緩衝液 (50mMグリシン、50 mM塩化ナトリウム、0.09%Na₃N含有、以下GBSと略す) 1.0mLに1.0%のΦ2 μmラテックス (ポリサイエンス社) を懸濁させたGBS 1mLを加え、37℃で2時間インキュベーションした後、感作したラテックス懸濁液を遠心分離 (10000rpm、15分) して上清を除去した。沈殿を2%牛血清アルブミン-GBSに懸濁させ、37℃で1時間インキュベーションした後、再び遠心分離 (10000rpm、10分) して上清を除去した。沈殿を0.2%牛血清アルブミン、10%ショ糖、5%塩化コリンを含むGBS、pH8.2に懸濁させ、抗ヒトCEA抗体感作ラテックス試薬 (ラテックス濃度1% W/V、2 μm試薬) を調製した。同様に、Φ3 μmのラテックス (ポリサイエンス社) を使用して3 μm試薬を調製した。

(2) 測定装置

- 35 -

コールターカウンター（ベックマンコールター社）と4種類のアパーチャー（口径 $20\mu\text{m}$ 、 $50\mu\text{m}$ 、 $70\mu\text{m}$ 、 $100\mu\text{m}$ ）を使用した。

（3）測定方法

正常血清 $0.5\mu\text{L}$ と試薬2 $0.5\mu\text{L}$ を混合した後、図1 (B)の電極付セルに分注し、
5 交流電圧（周波数100KHz、12V、方形波）を60秒間印加してパールチェーンを形成した後、直ちに電源を切り、生理食塩水20mLに添加して転倒混和した。混和した反応液中のラテックス粒子をコールターカウンターにより計数した。

（4）結果 結果を表2に示した。

表2

	アパーチャー (Ap) の口径			
	$20\mu\text{m}$	$50\mu\text{m}$	$70\mu\text{m}$	$100\mu\text{m}$
詰りやすさ(%)	50%以上	15%	2%	2%以下
$2\mu\text{m}$ 試薬の測定	A; 可能	A; 可能	B; 可能	C; 可能
口径/粒子径	10倍	25倍	35倍	50倍
$3\mu\text{m}$ 試薬の測定	B; 可能	A; 可能	A; 可能	B; 可能
口径/粒子径	6.7倍	16.7倍	23.3倍	33.3倍

10 表2中「詰りやすさ(%)」とは、各口径のアパーチャーを使用して計数したときの、アパーチャーが担体粒子によって詰った頻度を示す。たとえば、 $20\mu\text{m}$ のアパーチャーを使用した場合、詰りやすさ(%)は50%以上である。これは、反応液中のラテックス粒子を計数したとき、2回の測定で少なくとも1回は、アパーチャーにおける担体粒子の詰まりが、測定結果に影響したこと意味している。測定回
15 数は、 $2\mu\text{m}$ 試薬と $3\mu\text{m}$ 試薬の合計である。つまり「詰りやすさ(%)」は、アパーチャーの詰りやすさを表している。

また「A/B/C; 可能、または不可」とは、各口径のアパーチャーを使用して計数したときの測定精度の評価の比較結果を示している。評価基準は以下のとおりである。なおSN比とは、 $N(\text{noise}) \div S(\text{signal})$ 、すなわち「誤って凝集粒子として
20 計数された非凝集粒子（単粒子）数」／「真の非凝集粒子（単粒子）数」である。

- 36 -

平均粒子径が $2\ \mu\text{m}$ 、および $3\ \mu\text{m}$ の試薬を用いたとき、ブランク検体（AFP濃度が検出限界以下）の非凝集粒子（単粒子）を最も正確にかつ精度良く測定できたアパーチャーサイズは $20\ \mu\text{m}$ であった。この結果に基づいて、アパーチャーサイズが $20\ \mu\text{m}$ の条件で計数した非凝集粒子（単粒子）数を「真の非凝集粒子（単粒子）数」とした。一方、各アパーチャーサイズで計数された非凝集粒子（単粒子）数と「真の非凝集粒子（単粒子）数」の差が、各アパーチャーサイズにおける「誤って凝集粒子として計数された非凝集粒子（単粒子）数」である。

A: ラテックス粒子を計数したとき、非凝集粒子（単粒子）と2個に凝集した粒子の区別が明確かつ再現性よく測定でき、そのSN比が1.5以下の場合

B: SN比が1.5～3未満の場合

C: 非凝集粒子（単粒子）と2個に凝集した粒子の区別が明確に測定できないか、あるいは単粒子が正確に検出できず、SN比が3～6未満の場合

不可: SN比が6以上の場合

A/B/Cの順に測定精度が低いことを示す。 $2\ \mu\text{m}$ ラテックス粒子の試薬を測定した場合、口径 $20\sim70\ \mu\text{m}$ のアパーチャーは精度良く計数できる（AまたはB）。一方、口径 $100\ \mu\text{m}$ のアパーチャーでは測定精度がやや劣る（C）ことを示している。

$2\ \mu\text{m}$ クラスの担体粒子を使用する場合は、口径が $50\ \mu\text{m}$ 以下のアパーチャーでは詰りやすく、 $100\ \mu\text{m}$ 以上では測定精度が良くない。よって、 50 以上 $100\ \mu\text{m}$ 未満のアパーチャーが適し、特に口径 $70\ \mu\text{m}$ のアパーチャーが適していることがわかる。一方、 $3\ \mu\text{m}$ クラスの担体粒子を測定する場合は、 $50\sim100\ \mu\text{m}$ のアパーチャーが適し、特に口径 $70\sim100\ \mu\text{m}$ のアパーチャーが適していることがわかる。つまり、アパーチャーサイズは、担体粒子の平均粒径に対して5倍～50倍とするのが好ましい。

- 37 -

(1) 抗AFP抗体感作ラテックス試薬の調製

実施例1と同様に操作して、抗ヒトAFP抗体感作ラテックス試薬を調製した。なお、 $\Phi 2\mu\text{m}$ 、 $3\mu\text{m}$ 、 $4.5\mu\text{m}$ 、 $6\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ のラテックス粒子を使用して、5種類の試薬を調製した。ラテックス粒子濃度はそれぞれ、1%、1%、3%、3%、10%
5 に調整した。

(2) 測定装置

コールターカウンターと2種類のアパーチャー ($\Phi 2\mu\text{m}$ ラテックス試薬のみ口径 $70\mu\text{m}$ アパーチャー、他のラテックス試薬は口径 $100\mu\text{m}$ アパーチャー)を使用した。

(3) 測定方法

10 検体 $3\mu\text{L}$ と抗AFP抗体感作ラテックス試薬 $3\mu\text{L}$ を混和して、図1(B)の電極付セルに分注し、交流電圧(周波数 100kHz 、 14V 、正弦波)を40秒間印加してパールチェーンを形成した後、直ちに電源を切り、生理食塩水 20mL に添加して転倒混和した。混和後の反応液中のラテックス粒子をコールターカウンターにより計数した。2個以上凝集した粒子数(P)と総粒子数(T)との比から凝集率を測定した。

15 (4) 結果 結果を表3に示した。

表 3

ラテックス粒子		凝集率 (P/T%)	
粒子径	最終反応液中のラテックス濃度	AFP 0 (ng/mL)	AFP 1000 (ng/mL)
$2\mu\text{m}$	0.5%	2.3	47.5
$3\mu\text{m}$	0.5%	2.6	43.0
$4.5\mu\text{m}$	1.5%	3.2	32.7
$6\mu\text{m}$	1.5%	4.7	20.4
$10\mu\text{m}$	5.0%	0.0	8.67

粒子径が $3\mu\text{m}$ 以下のとき凝集率のシグナルは40%以上と大きく、 $6\mu\text{m}$ 以上では凝集率のシグナルは20%以下に低下することがわかる。この結果と表2の結果も合わせて、本発明ではラテックスの粒子径は、 $1\sim 10\mu\text{m}$ が好ましく、
20 $\sim 5\mu\text{m}$ が最も好ましいことがわかる。

実施例 4

(1) 抗CEA抗体感作ラテックス試薬 (試薬2) の調製

実施例 2 と同様に、 $\Phi 2 \mu\text{m}$ のラテックスに抗ヒトCEA抗体を感作して、抗ヒト
5 CEA抗体感作ラテックス試薬 (ラテックス濃度 1 %W/V) を調製した。

(2) グリシン緩衝液 (試薬1) の調製

0.5%牛血清アルブミン、0.6mg/mL非特異抑制混合剤を含むGBS, pH8.2を調製し
試薬 1 とした。

(3) 測定装置

10 図 1 (A) の装置および (B) の電極付セルを使用して、抗原抗体反応に基づ
いて親和性物質 (抗原) を測定した。

(4) 測定方法

0.5%牛血清アルブミンを含むGBSを用いて、CEA抗原液を希釈して濃度0、0.015、
0.03、0.06、0.49、0.98、1.95、3.9、125、250、500ng/mLを調整した。これらの
15 検体 $1 \mu\text{L}$ と試薬1の $5 \mu\text{L}$ を混和して、 45°C で3分間インキュベーションした後、試
薬2を $6 \mu\text{L}$ 加え混和した後、電極付セルに注入した。このときの最終反応液中のラ
テックス濃度は0.5%である。前述の装置を使用して、室温下、交流電圧 (周
波数100KHz、12V、方形波) を60秒間印加してパールチェーンを形成した後、直ち
に電源を切り、コールターカウンター (アパーチャーは口径 $70 \mu\text{m}$ を使用) によ
20 りラテックス粒子を計数した。2個以上凝集した粒子数(P)と総粒子数(T)との比
から凝集率を測定した。

結果は図 8 に示した。

比較例 2

25 実施例 5 の各検体と試薬を同量ずつ試験管にとり、 37°C で20分間インキュ
ベーションした。この反応液 $0.5 \mu\text{L}$ を生理食塩水 20mL に希釈して、実施例 5

- 39 -

と同様にコールターカウンターを使用してラテックス粒子の粒度分布を測定して、同様に凝集率を算出した。また、実施例5と同様に5回繰り返し測定を行ない、その結果を表4、表5および図9に示した。

表4

パルス：100KHz、±12V、方形波

	0 (ng/mL)	0.015	0.03	0.06	0.49	0.98	1.95	3.9	125	250	500
1	2.66	5.51	7.42	10.54	17.68	21.09	23.84	26.54	39.23	43.52	48.22
2	2.56	5.35	7.51	10.04	17.76	20.33	24.07	26.09	39.78	42.21	47.54
3	2.53	5.64	7.32	10.29	18.00	20.50	23.90	26.23	38.67	42.84	47.39
4	2.85	5.48	7.31	10.33	17.47	20.42	24.35	25.69	NT	NT	NT
5	2.57	5.60	7.55	10.29	17.82	20.76	23.48	26.24	NT	NT	NT
Ave (%)	2.63	5.52	7.42	10.30	17.75	20.62	23.93	26.16	39.23	42.86	47.72
S. D.	0.130	0.113	0.108	0.178	0.194	0.308	0.319	0.309	0.555	0.655	0.442
2.6S.D	0.338	0.295	0.282	0.462	0.505	0.800	0.830	0.803	1.443	1.703	1.150
C. V. (%)	4.94	2.05	1.46	1.73	1.09	1.49	1.33	1.18	1.41	1.53	0.93

5

表5

対照：37°C、20分、インキュベーション

	0 (ng/mL)	0.015	0.03	0.06	0.49	0.98	1.95	3.9	125	250	500
1	2.55	NT	NT	NT	5.19	5.02	9.82	15.01	48.23	54.20	54.68
2	3.24	NT	NT	NT	6.59	7.78	10.81	16.03	47.98	52.87	53.87
3	2.50	NT	NT	NT	3.48	5.24	10.92	14.11	46.24	52.64	55.64
4	2.69	NT	NT	NT	7.42	7.31	12.08	15.53	NT	NT	NT
5	2.43	NT	NT	NT	3.77	7.44	12.62	14.69	NT	NT	NT
Ave (%)	2.68				5.29	6.56	11.25	15.07	47.48	53.24	54.73
S. D.	0.324				1.718	1.318	1.110	0.746	1.084	0.842	0.886
2.6S.D	0.842				4.466	3.426	2.885	1.939	2.818	2.190	2.304
C. V. (%)	12.07				32.5	20.1	9.86	4.95	2.28	1.58	1.62

抗原濃度が0の場合の測定値が、ある濃度の抗原を測定したときの値と識別できれば、この濃度の抗原を測定できる。測定可能な抗原濃度の最小値が、検出限界である。一般に抗原量0 ng/mLを測定した凝集率の平均値+2.6SDと、ある濃度を測定した凝集率の平均値-2.6SDの重なりがなければ、その濃度以上の抗原を検出することができる。

10

- 40 -

図8および図9から検出限界を比較すると、本発明の方法（図8）の検出限界は0.015 ng/mLといえる。一方、従来法（図9）における検出感度は1.9 ng/mLであり、本発明は100倍以上高感度である。また、本発明は各抗原量での再現性も良好でありCV値は概ね1~2%であり（抗原量1.95 ng/mLの同時再現性は、
5 本発明ではCV=1.33%従来法ではCV=9.86%）、抗原量500 ng/mLまで良好な直線性が得られている。これらのことから、電圧パルスを印加してパールチェーン化により反応を促進させた本発明は、従来法に比べ非常に短時間で更に高感度、ならびに良好な再現性であり、且つ直線性良く測定できることがわかる。

10 産業上の利用の可能性

本発明は、担体粒子の凝集を利用した、新規な親和性物質の測定方法を提供する。本発明の測定方法は、担体粒子の凝集を、粒子の三次元情報に基づいて計数する。その結果、より簡便な操作で、高精度な測定が可能となる。また測定のための装置は、安価な構成とすることができる。

15 また本発明においては、担体粒子の凝集を、粒子の三次元情報に基づいて計数するため、凝集反応のための反応空間の形状が制限されない。その結果、複数組の電極によって、異なる方向から電圧パルスを印加することができる。また反応空間を大きくすることによって、感度と再現性の向上が期待できる。

これに対して二次元の情報（面積）に基づいて担体粒子の凝集を観察する公知
20 の方法においては、焦点の合う限られた範囲の粒子しか観察できないため、反応空間の形状は著しく制限される。フォーカスを移動すれば観察範囲を広げることができるが、それでも平面的に走査するのが限界である。このように、本発明の測定方法は、公知の方法に比べて、より簡便で、かつ高精度な測定を可能とする方法である。

25 更に、電圧パルスの印加によって反応が促進される結果、より大きな担体粒子を利用することができる。その結果、測定精度の向上が期待できる。

- 41 -

請求の範囲

1. 次の工程を含む、親和性物質の測定方法。

(1)測定対象親和性物質との結合活性を有する結合パートナーを結合した担体粒
5 子と、測定対象親和性物質とを混合し、電圧パルスを加する工程、または
(1')測定対象親和性物質との結合活性を有する結合パートナーを結合した担体
粒子と、測定対象親和性物質とを、凝集試薬成分と混合し、電圧パルス
を加する工程であって、前記担体粒子は凝集試薬によって凝集し、かつ測
定対象親和性物質によってその凝集は阻害される工程

10 (2)工程(1)の後に、測定対象である親和性物質との結合によって形成された担
体粒子の凝集塊、および測定対象である親和性物質と結合せず凝集塊を形成
しなかった担体粒子のいずれかまたは両方を、その三次元情報を指標として
計数する工程、または

(2')工程(1')の後に、凝集試薬との結合によって形成された担体粒子の凝集塊、
15 および測定対象である親和性物質との結合によって凝集を阻害された担体
粒子のいずれかまたは両方を、その三次元情報を指標として計数する工程、
および

(3)工程(2)または(2')の後に、凝集塊の形成レベル、および凝集塊を形成しな
かった担体粒子のレベルのいずれか、または両方に基づいて測定対象物質の
20 レベルを決定する工程

2. 工程(2)または(2')において、凝集塊または担体粒子の三次元情報を、物理的
に測定する請求項1に記載の方法。

3. 三次元情報を物理的に測定するための方法が、電気抵抗法、レーザー回折散
乱法、および三次元画像解析法からなる群から選択されたいずれかの方法で
25 ある請求項2に記載の方法。

4. 電圧パルスが交流電圧パルスである請求項1に記載の方法。

- 42 -

5. 工程 (2) または (2') において、電場を停止後に担体粒子を計数することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。
6. 工程 (2) または (2') において、電場を停止後に更に付加的に担体粒子を希釈する工程を含む請求項 5 に記載の方法。
- 5 7. 電圧パルスを複数回与えることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。
8. 電圧パルスを印加後に、担体粒子を分散させてから次の電圧パルスを印加する工程を含む、請求項 7 に記載の方法。
9. 複数回の電圧パルスが、異なる方向の電圧パルスである請求項 7 に記載の方法。
- 10 10. 担体粒子の平均粒子径が、 $1\ \mu\text{m}$ 以上である請求項 1 に記載の方法。
11. 担体粒子の平均粒子径が、 $1\ \mu\text{m} \sim 20\ \mu\text{m}$ である請求項 10 に記載の方法。
12. 次の手段を含む、親和性物質の測定装置。
 - (a) 測定対象親和性物質との結合活性を有する結合パートナーを結合した担体粒子と、測定対象親和性物質とを保持する空間、
 - 15 (b) 前記空間に保持された担体粒子に電圧パルスを印加するための電極、および
 - (c) 前記空間に保持された担体粒子の凝集によって生じた凝集塊、および凝集しなかった前記担体粒子のいずれかまたは両方を、その三次元情報を指標として計数する手段
- 20 13. (c) 前記空間に保持された担体粒子の凝集によって生じた凝集塊、および凝集しなかった前記担体粒子のいずれかまたは両方を、その三次元情報を指標として計数する手段が、三次元情報を物理的に測定するための手段である請求項 12 に記載の装置。
14. 三次元情報を物理的に測定するための手段が、電気抵抗法、レーザー回析散乱法、および三次元画像解析法からなる群から選択されたいずれかの方法によって三次元情報を物理的に測定するための手段である請求項 13 に
- 25

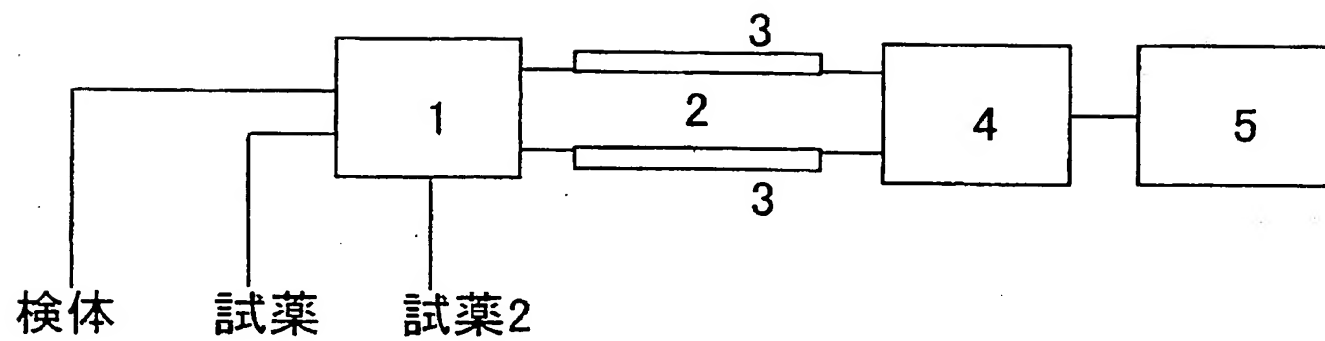
- 43 -

記載の装置。

15. 少なくとも2組の電圧パルスを印加するための電極を有する請求項12に記載の装置。
16. 電圧パルスを印加するための電極を駆動する手段を有し、前記空間に対して異なる方向の電場を与えることができることを特徴とする請求項12に記載の装置。
- 5

図 1

(A)



(B)

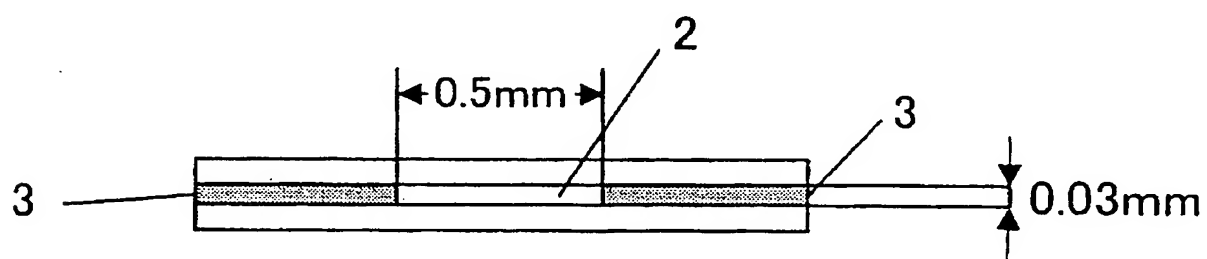
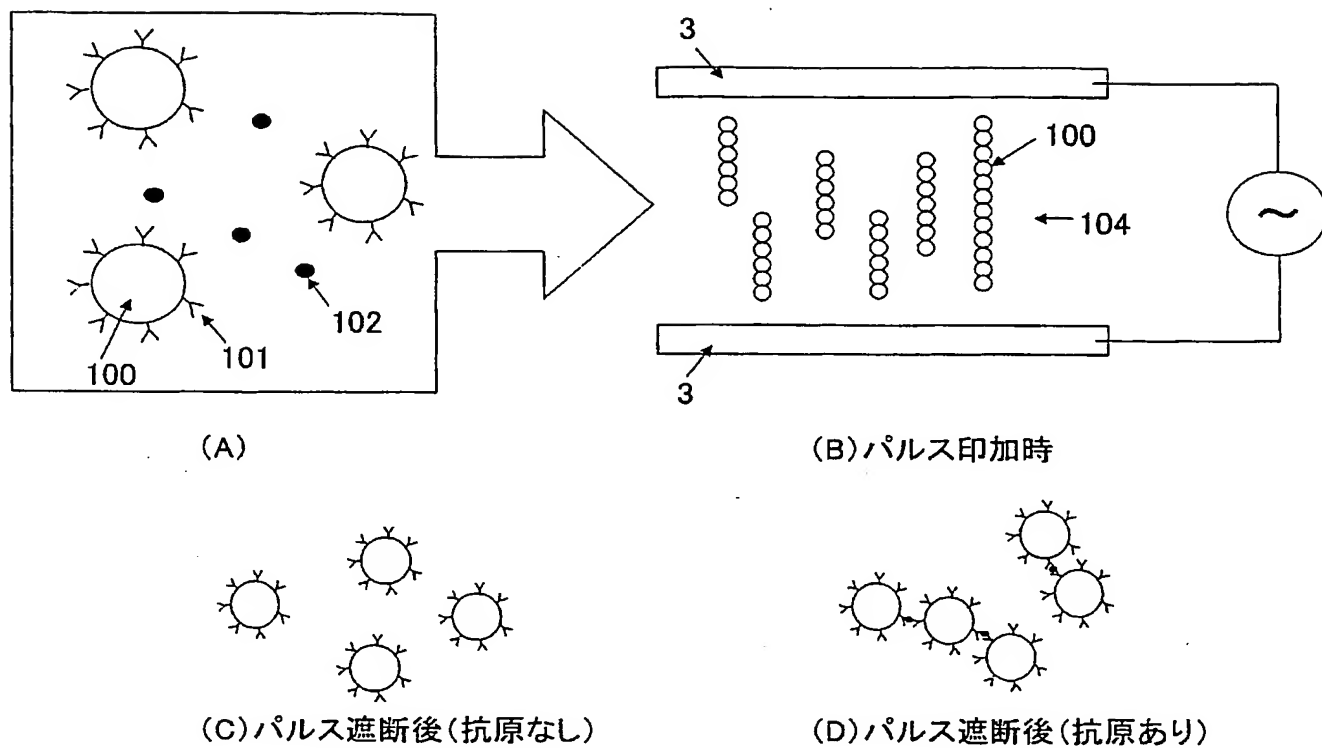


図 2



3 / 9

図 3

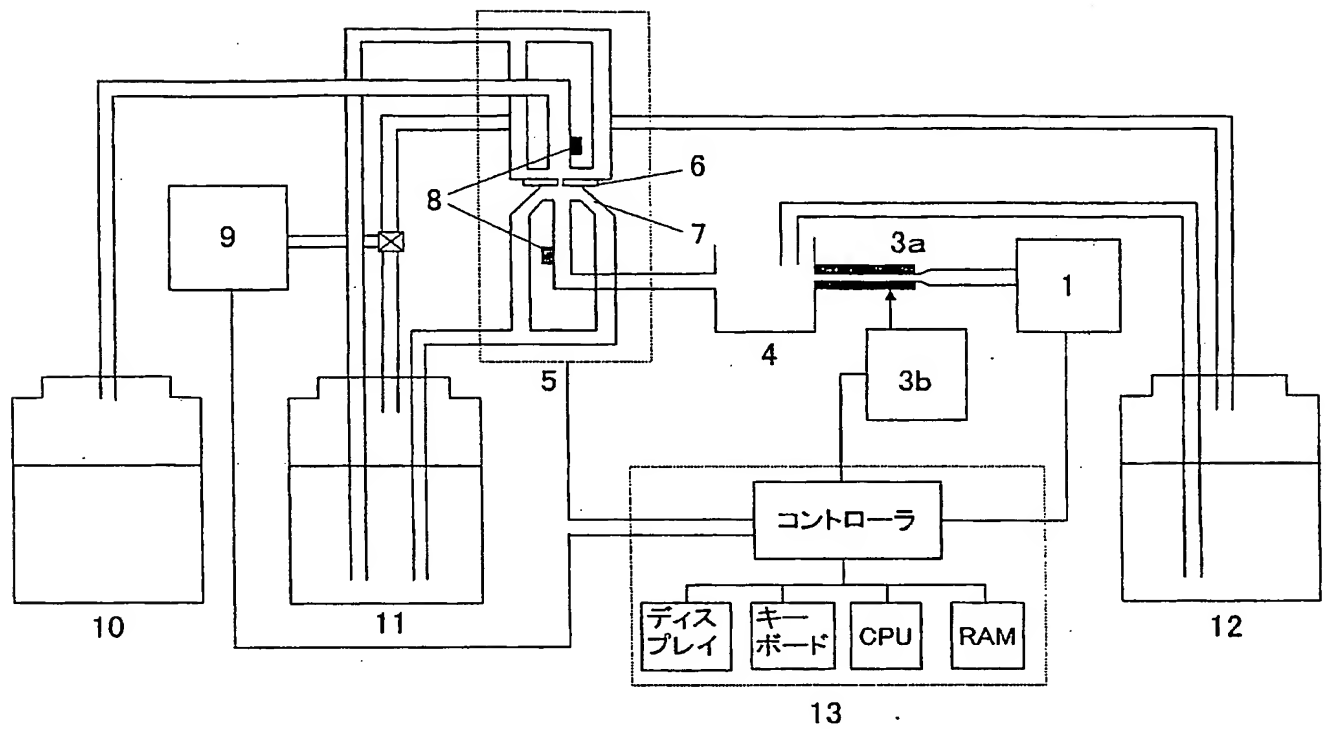


図 4

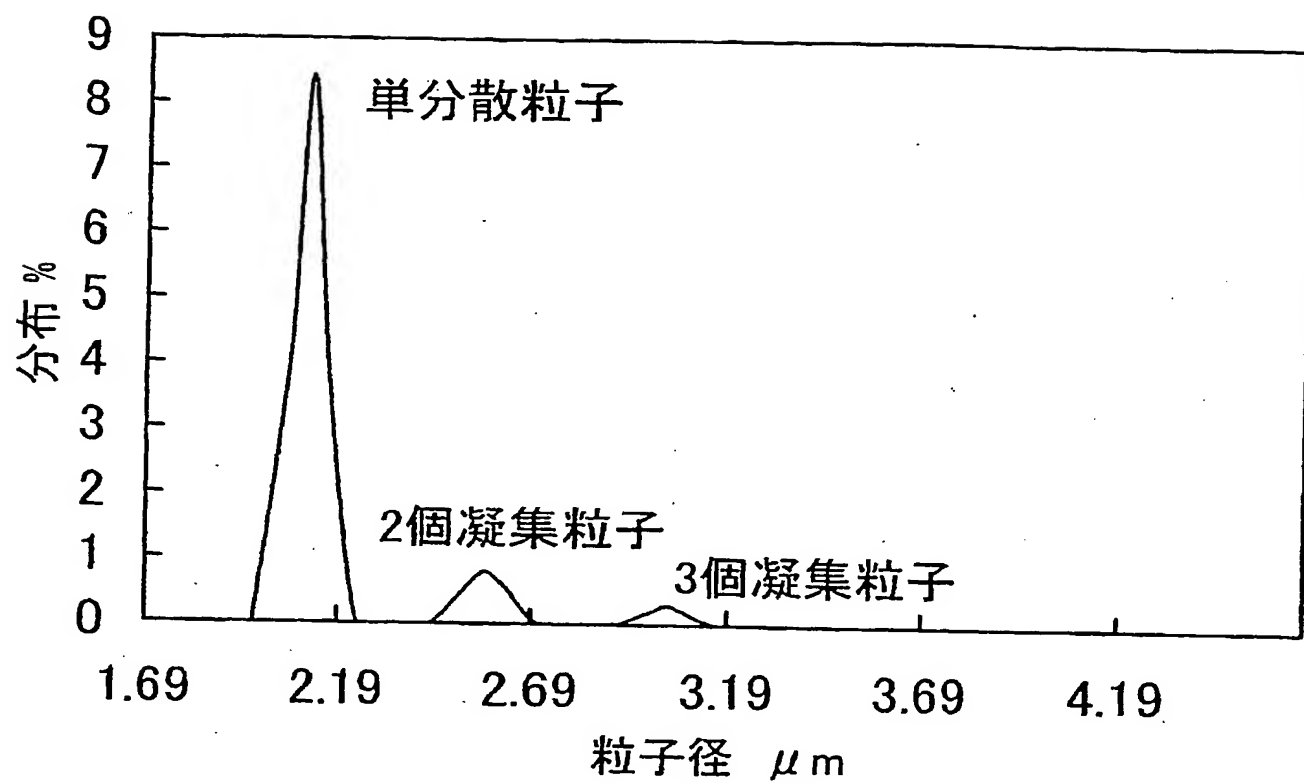


図 5

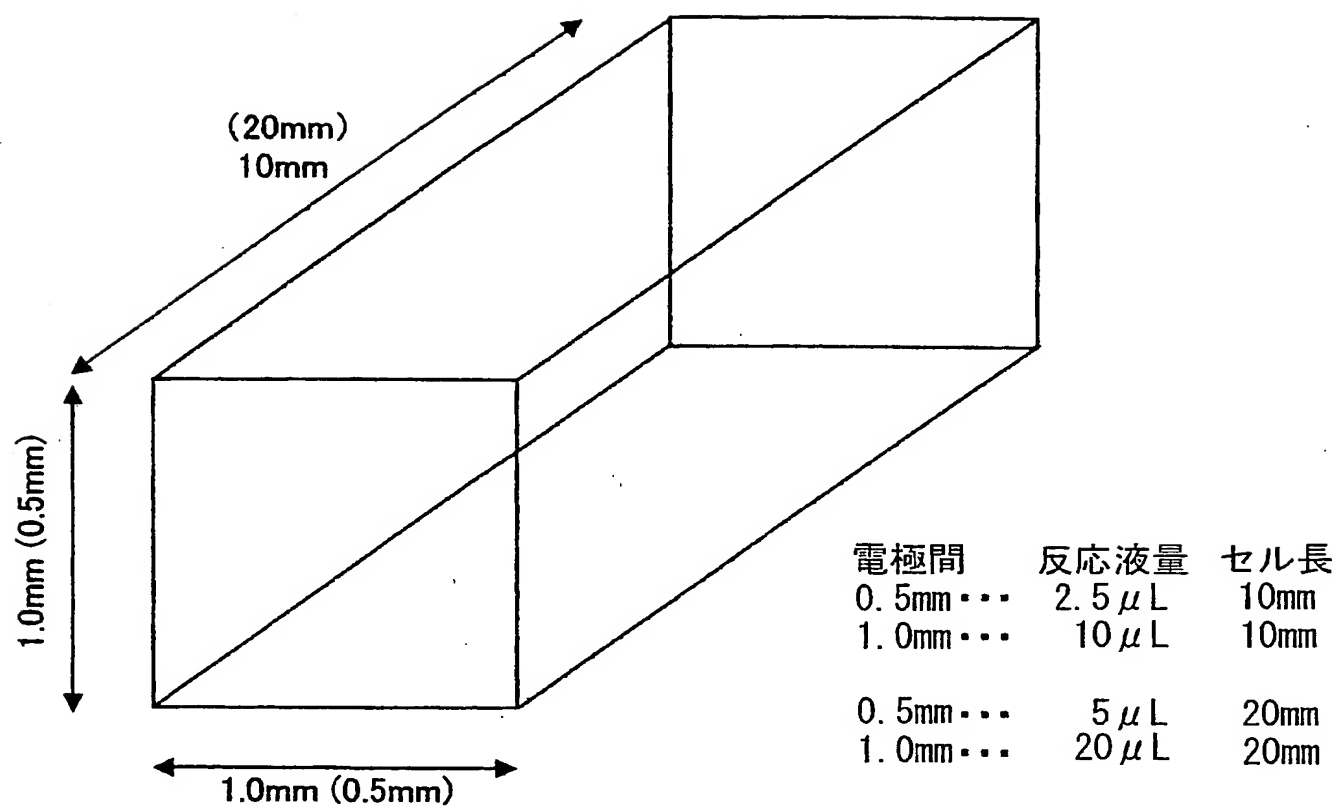


図 6

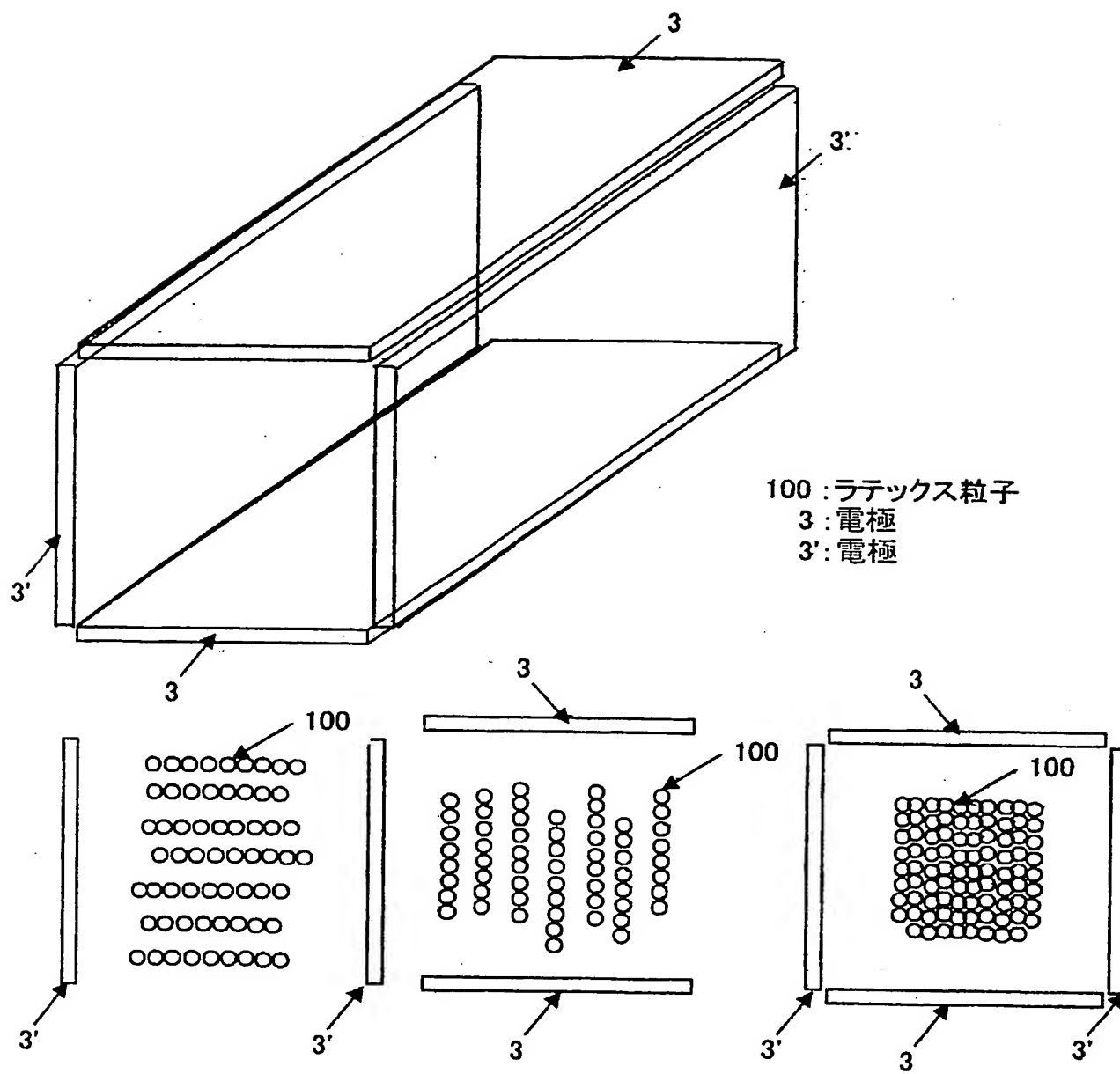


図 7

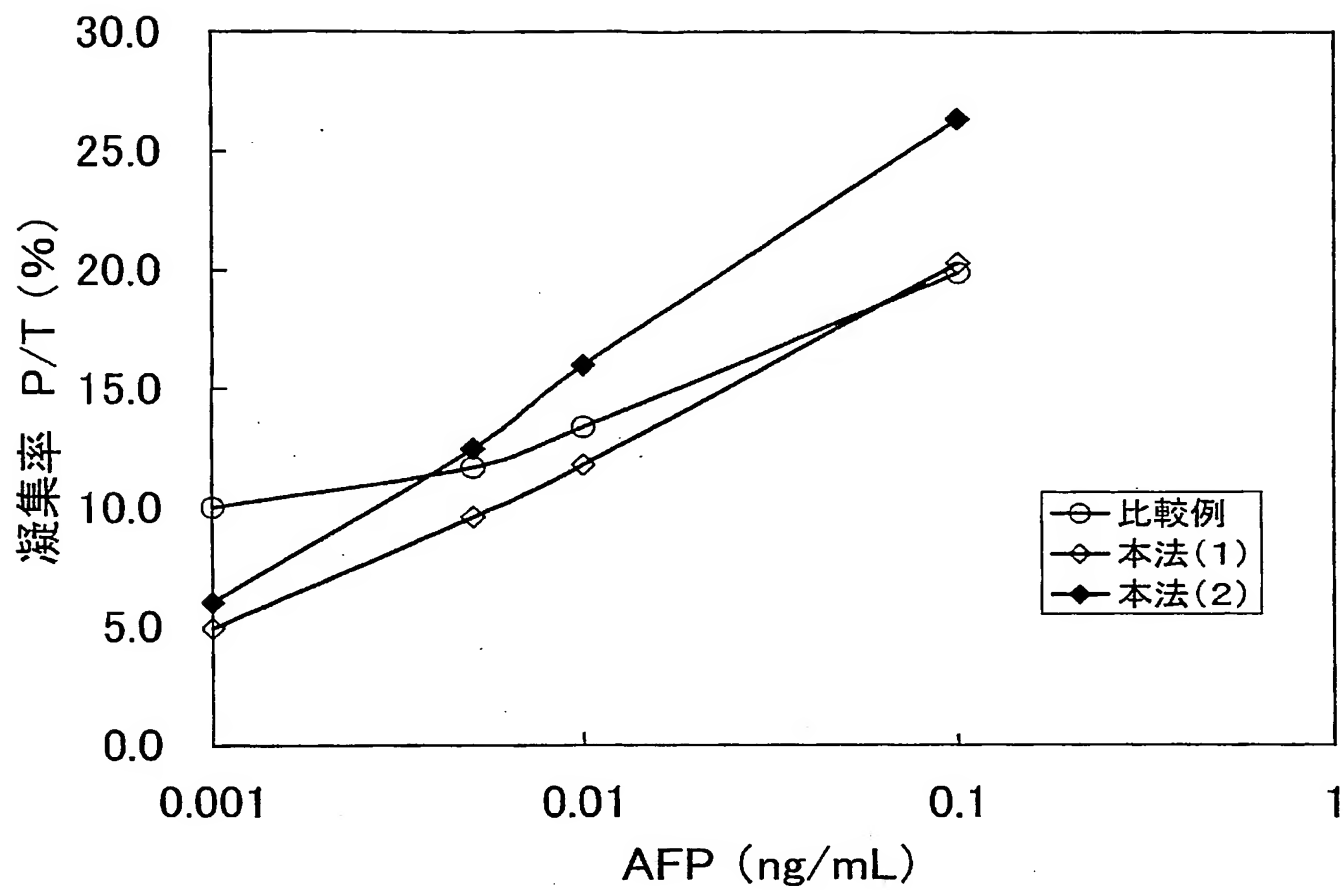
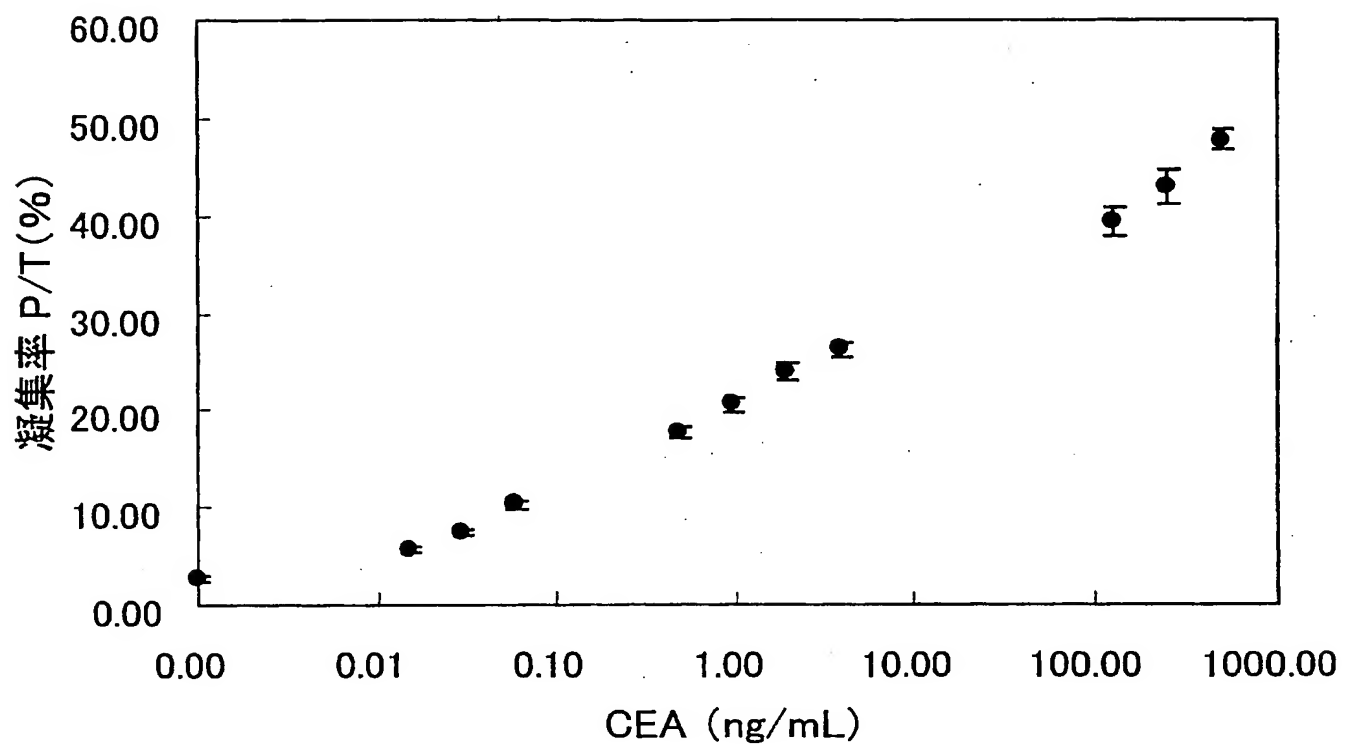
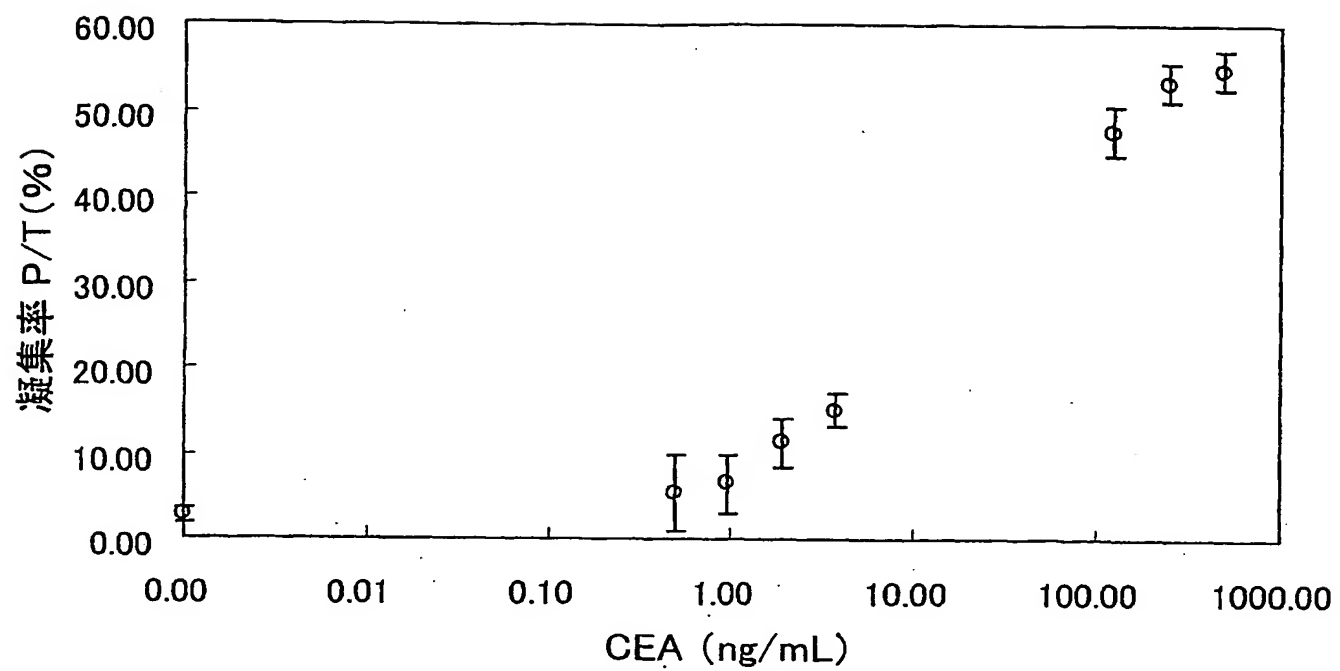


図 8



9 / 9

図 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008553

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/543, G01N15/02, G01N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/543, G01N15/02, G01N15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/ A	JP 07-083928 A (Masao KARUBE), 31 March, 1995 (31.03.95), Full text (Family: none)	1-8, 10-14/ 9, 15, 16
Y/ A	JP 01-259257 A (Toa Medical Electronics Co., Ltd.), 16 October, 1989 (16.10.89), Claims; page 9, upper left column, line 1 to lower right column, line 15 & US 5215714 A & EP 336013 A	1-8, 10-14/ 9, 15, 16
Y/ A	JP 07-128217 A (Toa Medical Electronics Co., Ltd.), 19 May, 1995 (19.05.95), Claims; Par. No. [0002] & US 5506673 A & EP 652428 A	1-8, 10-14/ 9, 15, 16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 July, 2004 (16.07.04)Date of mailing of the international search report
03 August, 2004 (03.08.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/543, G01N15/02, G01N15/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/543, G01N15/02, G01N15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2004年

日本国登録実用新案公報 1994-2004年

日本国実用新案登録公報 1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/A	JP 07-083928 A (軽部征夫) 1995. 03. 31 全文 (ファミリーなし)	1-8, 10-14/ 9, 15, 16
Y/A	JP 01-259257 A (東亜医用電子株式会社) 1989. 10. 16 特許請求の範囲、第9頁左上欄第1行-右下欄第15行 & US 5215714 A & EP 336013 A	1-8, 10-14/ 9, 15, 16
Y/A	JP 07-128217 A (東亜医用電子株式会社) 1995. 05. 19 特許請求の範囲、【0002】 & US 5506673 A & EP 652428 A	1-8, 10-14/ 9, 15, 16

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 07. 2004

国際調査報告の発送日

03. 8. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

2 J

9 2 1 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3251